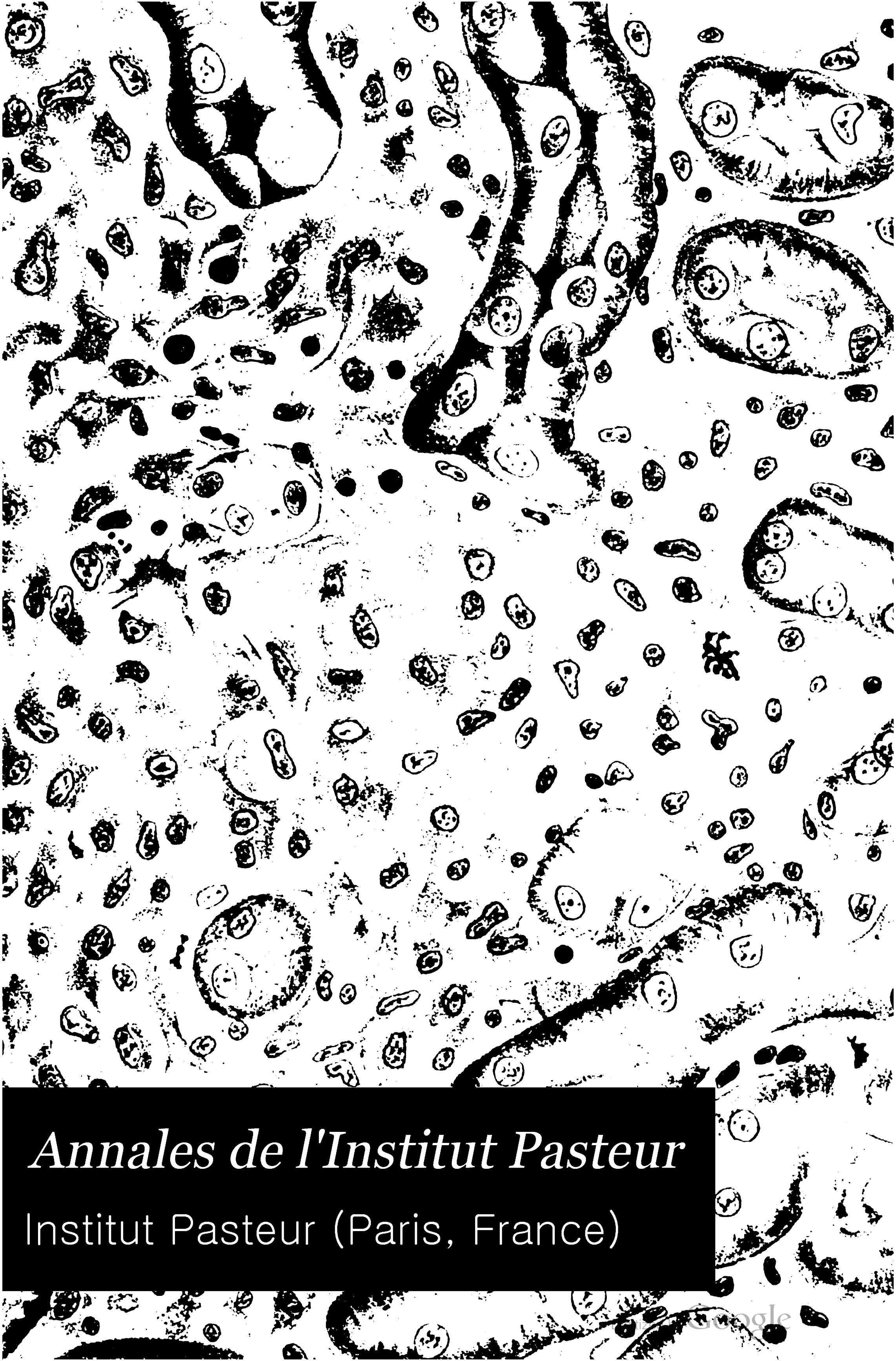

Annales de l'Institut Pasteur
Institut Pasteur (Paris, France)

ANNALES

DE L'INSTITUT PASTEUR

SCEAUX. — IMPRIMERIE CHARAIRE ET Cie.

ANNALES
DE L'INSTITUT PASTEUR

(JOURNAL DE MICROBIOLOGIE)

PUBLIÉES SOUS LE PATRONAGE DE **M. PASTEUR**

PAR

E. DUCLAUX

MEMBRE DE L'INSTITUT
PROFESSEUR A LA SORBONNE

Et un Comité de rédaction composé de MM.

TOME HUITIÈME
1894
AVEC TREIZE PLANCHES

PARIS
G. MASSON, ÉDITEUR
LIBRAIRE DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE
120, BOULEVARD SAINT-GERMAIN
EN FACE DE L'ÉCOLE DE MÉDECINE

8me ANNÉE JANVIER 1894. No 1.

ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

DÉVELOPPEMENT DU CHARBON CHEZ LE LAPIN

D'APRÈS LES TABLEAUX MICROSCOPIQUES DU FOIE ET DE LA RATE.

Par M. WERIGO.

Dans un article précédent, (Ces *Annales* 1892), j'ai démontré que les bactéries charbonneuses virulentes, injectées dans le système sanguin du lapin, sont englobées par les globules blancs et par les autres cellules phagocytaires avec une rapidité extrême, dont on n'avait jusqu'ici aucune idée. Il était intéressant de savoir comment les bactéries englobées au début deviennent libres par la suite. Pour cela, il fallait étudier tous les stades du développement de la maladie charbonneuse. Cette étude est d'autant plus utile qu'il n'y a encore aucune maladie infectieuse pour laquelle les phénomènes qui se produisent dans l'organisme aient été systématiquement suivis, dès les premiers moments de l'inoculation jusqu'à la mort de l'animal.

Pour se faire une idée complète du développement d'une maladie, il faudrait évidemment étudier tous les organes des animaux tués à différents stades; pour être sûr qu'aucun stade n'a échappé à l'observation, il faudrait sacrifier un nombre considérable d'animaux. Le manque de temps m'a obligé à me borner. L'étude détaillée de la succession des phénomènes ayant pour moi une importance majeure, je me suis décidé à restreindre le nombre des organes étudiés et à augmenter autant que possible le nombre d'animaux étudiés à différents stades de la maladie. En ce qui concerne les organes, j'ai choisi le foie et la rate, que j'ai étudiés à tous les stades, et les poumons, que je n'ai examinés que chez quelques animaux.

On sait que la maladie charbonneuse se prolonge souvent chez les lapins pendant plusieurs jours. Pour en accélérer le

plus possible la marche et pour lui donner plus de régularité, j'inoculais toujours mes animaux en leur injectant, dans la veine de l'oreille, une quantité relativement très grande de bactéries. Le liquide injecté était préparé comme je l'ai dit dans mon article précédent. Je dois seulement ajouter que j'injectais dans ces nouvelles expériences le contenu d'un seul tube d'Esmarch, de sorte que la quantité de bactéries injectées était deux fois moindre qu'auparavant. Les animaux étaient tués successivement 2 1/2, 5, 7 1/2, 8, 10, 20, 40 minutes, 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 25 1/2, 26 1/2, 27 1/2 heures après les injections. A ces animaux j'en ai encore ajouté deux : un qui a succombé à la maladie 28 1/2 heures après l'inoculation; l'autre que j'ai sacrifié 19 1/2 heures après l'injection, quand il était déjà dans l'agonie. Le foie et la rate ont été étudiés chez ces trente-trois animaux (je ne possède pas de préparations de la rate de l'animal tué 40 minutes après l'inoculation) : les poumons n'ont été étudiés que chez les animaux tués 5, 8 minutes, 3, 7 et 9 heures après l'inoculation. Pour les inoculations je me servais toujours de cultures de la bactéridie charbonneuse asporogène, que m'a gracieusement remises Mme Metchnikoff. Les méthodes que j'employais pour faire des préparations et les colorer sont les mêmes que celles dont je me suis servi dans mon travail précédent.

Pour me faire une idée plus précise au sujet des particularités caractéristiques de chaque stade, je ne me bornais pas seulement à un simple examen des préparations, mais je tentais toujours, dans la mesure du possible, d'exprimer tous les faits principaux par des chiffres. Pour cela, je comptais sur mes préparations du foie et de la rate : 1° le nombre total de bactéries ; 2° le nombre de bactéries englobées par les leucocytes ; 3° le nombre de bactéries normales et dégénérées. Je comptais le nombre total de bactéries le plus soigneusement possible, et notamment, je comptais sur plusieurs (3-6) préparations de chaque animal toutes les bactéries trouvées sur 300-500 champs de vision (Reichert, *Immersion homogène*, n° 8). Pour toutes les autres numérations, je notais l'état de 100-300 bactéries trouvées successivement sur quelques (2-4) préparations de chaque stade de la maladie ; je comptais encore la quantité de globules blancs qu'on trouve dans les préparations du foie et de la rate.

Comme le nombre de ces globules était, dans la plupart des cas, excessivement grand, il était presque impossible de les compter aussi soigneusement que les bactéries. C'est pourquoi je me suis borné à compter sur trois préparations de chaque stade tous les globules que j'ai rencontrés sur 30 champs de vision (10 champs de vision sur chaque préparation). Les résultats de toutes ces numérations sont insérés dans les Appendices.

Je dois faire encore quelques remarques en ce qui concerne la succession des stades de la maladie. Le charbon, chez le lapin, est, comme on le sait, une maladie des plus irrégulières : les animaux survivent à l'inoculation pendant des temps très différents. Quoique la méthode que j'employais pour les inoculations me garantit un peu contre les irrégularités excessives, je n'ai pu rendre la marche de la maladie tout à fait constante. C'est pourquoi le temps écoulé depuis l'inoculation n'a pu me servir, dans tous les cas, comme un moyen sûr pour juger des progrès qu'avait déjà faits la maladie. Il fallait donc avoir un autre moyen. Je me suis basé sur le nombre des bactéries contenues dans la rate. Nous verrons par la suite que l'organisme lutte avec succès contre les bactéries pendant un temps plus ou moins long, pendant lequel le nombre de microbes qu'on rencontre dans les organes est toujours relativement petit. La victoire décisive des bactéries se manifeste tout d'abord par l'augmentation de leur quantité dans la rate, augmentation qui progresse dans la suite jusqu'à la mort de l'animal. En utilisant ce fait, je classais les stades de la maladie de mes animaux d'après le temps écoulé depuis l'inoculation, si le nombre de bactéries dans la rate n'était pas grand, et d'après ce nombre dans les cas contraires.

J'ai étudié, comme je l'ai déjà dit, trois organes : le foie, la rate et les poumons. C'est pourquoi je divise mon article en trois parties consacrées à l'étude spéciale de chacun de ces organes. A ces trois parties, j'en ajouterai une quatrième, où je tenterai d'exposer la marche complète de la maladie, et une cinquième consacrée aux conclusions générales à tirer de tous les faits relatés dans cette étude.

I. — PHÉNOMÈNES DANS LE FOIE.

En décrivant, dans mon article de 1892, les tableaux microscopiques du foie immédiatement après l'injection des bactéries charbonneuses, je me suis borné à indiquer qu'ils sont analogues à ceux que l'on voit après une injection de carmin. D'après cela, nous savons seulement que les bactéries sont englobées par les cellules (cellules endothéliales des vaisseaux capillaires du foie et globules blancs) avec une rapidité extrême, de sorte qu'il est difficile de trouver des bactéries libres, même quelques minutes après l'injection. Je me suis borné à cette courte indication, parce qu'elle était suffisante pour démontrer le rôle des leucocytes dans la protection du sang contre toute invasion des microbes, ce qui était alors pour moi le plus important. Une description plus détaillée est maintenant nécessaire, et je commencerai par les tableaux observés dans le foie du lapin tué 7 minutes 1/2 après l'injection. Je choisis ce stade, parce que nous y trouvons déjà bien développés presque tous les phénomènes avec lesquels nous aurons affaire pendant toute la marche de la maladie : en outre, ce stade nous permet quelques conclusions au sujet de l'origine des modifications observées.

Les modifications les plus importantes se trouvent dans les cellules endothéliales des vaisseaux capillaires. Plusieurs de ces cellules sont gonflées, leur protoplasma est augmenté de volume, et parfois bourré par une grande quantité de grains de pigment, d'une couleur jaune brunâtre ou même brun foncé. C'est sur les préparations colorées par l'hématoxyline qu'apparaît le mieux le pigment. Parmi ces grains, on voit çà et là, dans le protoplasma des cellules, des globules rouges plus ou moins altérés, et, en général, tous les intermédiaires entre les globules rouges presque intacts et les grains de pigment, de sorte qu'on doit considérer ces derniers comme les résidus des globules rouges détruits dans l'intérieur du protoplasma des cellules endothéliales. Quelques-unes de ces cellules conservent encore plus ou moins leur forme normale (voir la fig. 1, pl. I), tandis que les autres, poussant des prolongements le long des vaisseaux capillaires, se présentent sous une forme étoilée irrégulière (voir les figures 2, 3, pl. I).

Outre les formes décrites, qui proviennent évidemment des cellules endothéliales, nous en trouvons d'autres beaucoup plus compliquées. Nous rencontrons notamment çà et là, dans les vaisseaux capillaires, des cellules qui, au lieu d'un, ou au plus de deux noyaux, qu'on trouve d'ordinaire dans les cellules endothéliales normales, en contiennent une quantité beaucoup plus grande — 5, 10 et plus. Ces cellules compliquées présentent les figures les plus bizarres, de sorte que leur description détaillée est tout à fait impossible. Je ferai remarquer seulement que leurs formes s'adaptent à celles des vaisseaux capillaires, qui sont ici largement dilatés. Les figures 4, 5 et 6 (pl. I) pourront donner au lecteur quelque idée de ces cellules étranges.

Quelle est l'origine de ces cellules ? Comme elles sont toutes situées dans les vaisseaux capillaires, là où dans le foie normal nous ne trouvons que les cellules endothéliales, il semble indispensable d'admettre que ces dernières prennent part à leur formation. C'est d'autant plus nécessaire que nous trouvons tous les stades intermédiaires entre les cellules endothéliales normales et les cellules polynucléaires les plus compliquées. Mais les autres éléments cellulaires doivent aussi prendre part à leur formation. En effet, si quelques cellules proviennent de la fusion des cellules endothéliales voisines ou de la division de leurs noyaux (nous trouvons parfois dans les vaisseaux capillaires, des cellules en état de division kariokinétique), ce sont seulement les cellules relativement peu compliquées, avec 2 ou 3 noyaux, qui ont cette origine; les cellules multinucléaires exigent une autre explication.

Ce qui me semble le plus probable, c'est qu'elles se forment par la fusion des cellules endothéliales avec les éléments unicellulaires du sang, leucocytes mononucléaires et lymphocytes. Les tableaux microscopiques sont complètement d'accord avec cette supposition. Nous trouvons notamment dans les cellules compliquées, à côté de plusieurs noyaux d'un caractère endothélial (grands noyaux vésiculaires faiblement colorés), un ou plusieurs noyaux plus petits et beaucoup mieux colorés, qui sont tout à fait semblables à des noyaux de leucocytes mononucléaires. Le lecteur pourra les trouver sans peine sur nos figures. On trouve encore souvent des noyaux d'un caractère inter-

médiaire, de sorte qu'on doit admettre que les noyaux des leucocytes fusionnés avec les cellules endothéliales peuvent se transformer et acquérir les propriétés des noyaux endothéliaux. On peut s'expliquer ainsi facilement l'origine de toutes les cellules endothéliales modifiées contenant plusieurs noyaux. Cette fusion des leucocytes mononucléaires avec des cellules endothéliales me semble de la plus haute importance dans la formation des cellules dont il s'agit ici. Toutefois, pour éviter les malentendus possibles, je désignerai, dans la suite, toutes les cellules modifiées comme *macrophages hépatiques*, parmi lesquels je distinguerai *les macrophages hépatiques simples* à un noyau, et *les macrophages hépatiques compliqués* à plusieurs noyaux. Je conserverai le nom de *cellules endothéliales* pour celles qui sont tout à fait normales et qui n'ont encore subi aucune modification bien caractérisée.

En ce qui concerne la fréquence des différentes formes des macrophages hépatiques, je dois faire remarquer que les formes compliquées avec une grande quantité de noyaux sont relativement rares : la plupart des macrophages ne contiennent que deux ou trois noyaux. Il est à peine nécessaire de mentionner que nous trouvons partout beaucoup de cellules tout à fait normales à côté des macrophages hépatiques, c'est-à-dire des cellules endothéliales modifiées.

Cette description des macrophages hépatiques n'est pas encore complète, parce que nous avons laissé jusqu'ici de côté les relations de ces cellules avec les leucocytes polynucléaires. Les différentes formes de ces relations sont exposées dans mon article précédent, à l'endroit où j'ai décrit les phénomènes qui se passent dans le foie après les injections de carmin; j'y ai mentionné que les mêmes formes s'observent aussi après les injections de bactéries. En effet, les macrophages hépatiques (simples et compliqués) englobent souvent plus ou moins de leucocytes, qui sont tantôt vides, tantôt contenant des bactéries englobées (ici et dans la suite, je comprendrai toujours sous le nom de leucocytes ou de globules blancs les leucocytes polynucléaires). L'englobement des leucocytes est, dans la plupart des cas, tout à fait complet, de sorte que les leucocytes sont entourés par le protoplasma des macrophages (voir fig. 3, 5, 6, pl. I), ce qui est bien visible, parce que le protoplasma des

macrophages se colore beaucoup mieux que celui des leucocytes. Dans les cas où les leucocytes englobés contiennent dans leur intérieur des bactéries, on observe souvent qu'une partie de la bactérie est située encore dans l'intérieur du leucocyte, tandis qu'une autre se trouve déjà dans le protoplasma du macrophage (voir fig. 3, pl. I). Dans quelques cas, relativement très rares, il est vrai, on trouve un leucocyte fusionné avec un prolongement du macrophage, et la bactérie logée le long de ce prolongement, contenue ainsi simultanément dans le protoplasma du leucocyte et dans celui du macrophage (voir fig. 2, pl. I). On peut expliquer des tableaux de ce genre en admettant que les leucocytes transfèrent les bactéries englobées aux macrophages, explication que j'ai appliquée, dans mon article précédent, aux phénomènes analogues après les injections de carmin.

Quel est le sort des leucocytes englobés par les macrophages? Deviennent-ils libres après avoir transmis leurs bactéries, ou périssent-ils dans le protoplasma du macrophage en secondant ainsi son accroissement ultérieur? Les tableaux observés ne permettent pas de donner une réponse sûre à ces questions[1]. Je puis seulement mentionner que la plupart des leucocytes englobés présentent un aspect complètement normal : les signes évidents de leur destruction ne s'observent que très rarement.

Bactéridies. — Passant maintenant aux bactéries qu'on trouve dans le foie, nous devons tout d'abord noter comme une règle générale que les bactéries, sauf celles qui sont englobées par des leucocytes, se trouvent presque toujours dans l'intérieur des cellules endothéliales modifiées, c'est-à-dire dans l'intérieur des macrophages hépatiques. Il est vrai que nous trouvons parfois les bactéries dans des cellules endothéliales presque normales; mais ces cas sont relativement très rares. C'est pourquoi nous devons admettre

1. Dans mon article précédent, j'ai admis que les globules blancs, après avoir transmis leur carmin aux cellules endothéliales, deviennent libres et entrent de nouveau dans la circulation générale. Je ferai remarquer ici que cette explication, quoique la plus probable, n'est pas absolument indispensable. Il se peut aussi que tout aboutisse à la destruction définitive des globules dans l'intérieur des macrophages. A propos, je ferai remarquer encore que la plupart des tableaux décrits ci-dessus peuvent être retrouvés dans le foie des lapins qui ont reçu des injections de carmin. Mais dans ce dernier cas, ils sont beaucoup plus rares et beaucoup moins compliqués qu'après les injections de bactéries.

que la modification des cellules endothéliales est une réaction cellulaire due aux bactéries englobées : les cellules se modifient pour être plus appropriées à la lutte contre ces bactéries.

Nous pouvons nous convaincre de l'existence d'une lutte entre les cellules et les bactéries en étudiant de plus près l'état de ces dernières. Et, en effet, à côté des bactéries tout à fait normales, c'est-à-dire colorées en bleu intense et pourvues de contours nets et réguliers, nous en trouvons d'autres faiblement colorées avec des contours plus ou moins irréguliers. Nous trouvons ensuite des bactéries dont la coloration est encore plus défectueuse : ces bactéries ne se colorent que par places, et se présentent sous l'aspect singulier d'un amas de grains bleus rangés en ligne et inégalement colorés. Enfin, nous trouvons çà et là quelques grains qui ne peuvent être considérés comme les débris des bactéries qu'en les comparant aux autres formes que je viens de décrire. En un mot, nous trouvons ici les tableaux déjà souvent observés, et qui sont toujours considérés comme les différents stades de la dégénérescence des bactéries dans l'intérieur des phagocytes. Comme ces formes font presque complètement défaut dans les cultures injectées, et se trouvent partout dans nos préparations du foie, nous devons reconnaître que les macrophages hépatiques possèdent une énergie extraordinaire pour la destruction définitive des bactéries englobées : sept minutes et demie suffisent pour que leur destruction soit déjà très avancée. Il est probable que l'activité des macrophages dans cette voie se rattache d'une manière quelconque à la destruction des globules rouges : partout où nous trouvons des bactéries en voie de dégénérescence, nous trouvons aussi des grains de pigment qui entourent, souvent plus ou moins complètement, les bactéries, comme on peut le voir sur les figures 1, 4, 5, etc.

Pour terminer la description des phénomènes qu'on observe dans le foie, sept minutes et demie après l'injection des bactéries, je dois rappeler au lecteur qu'une grande quantité de bactéries se trouvent encore, dans le foie, englobées par les leucocytes, comme cela est décrit dans mon article précédent : 20 0/0 à 30 0/0 du nombre total de bactéries se trouvent dans cet état[1].

1. Dans mon article précédent, où je n'ai pas fait de numérations spéciales, je croyais que ce nombre est encore plus grand et qu'il atteint la moitié du nombre total de bactéries.

Un certain nombre de bactéries contenues dans les leucocytes sont aussi dans un état de dégénérescence plus ou moins marquée. Mais ce nombre est beaucoup inférieur à celui que contiennent les macrophages hépatiques; ce qui prouve que les leucocytes, quoique capables de digérer les bactéries englobées, sont toutefois plus faibles que les macrophages. Nous comprendrons alors pourquoi les leucocytes cèdent ordinairement leurs bactéries aux macrophages.

Passant à présent à la description des phénomènes que l'on observe pendant toute la marche de la maladie, je commencerai par les variations du nombre de bactéries aux différents stades.

Le lecteur trouvera dans les Appendices les chiffres que j'ai obtenus en comptant les bactéries sur les préparations de tous mes lapins. Ici, je me bornerai seulement à présenter une courbe que j'ai construite d'après ces chiffres, et dont l'abscisse correspond aux différents stades, tandis que les ordonnées représentent le nombre de bactéries sur dix champs de vision des préparations de chaque stade. Les différents stades sont distribués d'après les principes que j'ai déjà développés auparavant. Pour que le lecteur puisse savoir à quel animal correspond un stade donné, je donne ci-dessous un petit tableau où, à côté des numéros des stades, je donne le temps qui s'est écoulé depuis l'injection jusqu'au moment où l'animal a été sacrifié.

Temps	2 1/2',	5',	7 1/2',	10',	15',	20',	40',	1 h.,	2 h.,	3 h.,
Nos des stades.								1,	2,	3.

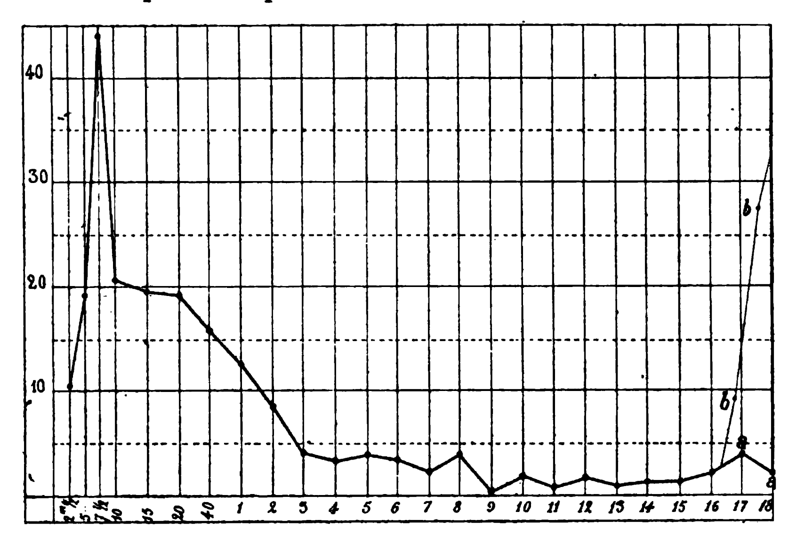
Temps	4 h.,	6 h.,	8 h.,	10 h.,	12 h.,	11 h.,	13 h.,	14 h.,	17 h.,
Nos des stades.	4,	5,	6,	7,	8,	9,	10,	11,	12,

Temps	18 h.,	19 h.,	26 1/2 h.,	15 h.,	25 1/2 h.,	9 h.,	20 h.,	7 h.,
					a	b	a	b
Nos des stades	13,	14,	15,	16,	17,		18,	

Temps	21 h.,	27 1/2 h.,	16 h.,	19 1/2 h.,	(agonie),	28 1/2 h. (mort)
Nos des stades	19,	20,	21,	22,	23.	

Au sujet de cette courbe, je dois faire remarquer que chacun de ces stades se rapporte à un seul animal, sauf les stades 17 et 18, où j'ai cru nécessaire d'en placer deux que j'ai désignés par *a* et *b*. J'ai fait cela parce que les animaux *b* m'ont présenté quelques particularités qui leur feront une place à part, quand nous décrirons les phénomènes qui se passent dans la rate. La

partie initiale de la courbe qui correspond à la première heure après l'injection est agrandie dans la direction de l'abscisse, afin de rendre plus facile la lecture des modifications qui se produisent très rapidement pendant cette heure.



D'après notre courbe, nous voyons que le nombre de bactéries dans le foie, après avoir atteint son maximum sept minutes et demie après l'injection, s'abaisse très rapidement pour rester à un niveau très bas pendant presque toute la marche de la maladie (jusqu'au 16e stade). Enfin (dès le 17e stade), on observe une augmentation du nombre des bactéries, qui va sans cesse progressant d'une marche rapide jusqu'à la mort de l'animal, où elles deviennent déjà innombrables. Ces derniers stades, caractérisés par une très grande quantité de bactéries dans le foie, ne pouvaient pas être représentés sur notre courbe, et le lecteur qui voudra les suivre plus complètement pourra trouver les chiffres correspondants dans les Appendices.

Nous pouvons ainsi diviser la maladie en trois périodes : 1° la période de l'abaissement progressif du nombre des bactéries, qui dure jusqu'à la 4e heure après l'injection (4e stade) ; 2° la période stationnaire jusqu'au 16e stade ; et enfin, 3° la période de l'accroissement du nombre des bactéries, depuis le 16e stade jusqu'à la mort de l'animal. Nous nous servirons, dans la suite, de cette division de la marche de la maladie.

Nous avons vu précédemment que les bactéries qu'on trouve dans le foie, sept minutes et demie après l'injection, sont déjà presque toutes englobées par des cellules. On observe le même fait pendant les deux premières périodes de la maladie : toutes les bactéries se trouvent englobées soit par des macrophages hépatiques, soit par les globules blancs; les bactéries sûrement libres font complètement défaut. Elles n'apparaissent qu'au commencement de la troisième période; leur quantité, qui est d'abord très petite, augmente de plus en plus, de sorte que, pendant les 22e (agonie) et 23e (mort) stades, presque toutes les innombrables bactéries qu'on trouve dans le foie sont libres.

Pendant la première période de la maladie, la plupart des bactéries sont englobées par les macrophages hépatiques : la quantité de bactéries dans les globules blancs est beaucoup plus petite. Avec le temps, cette relation change, de sorte que, pendant la période stationnaire, la quantité de bactéries, englobées par les leucocytes, égale et parfois dépasse la quantité correspondante dans les macrophages. Cette relation dure pendant toute la période stationnaire, sauf pendant son dernier stade, où nous observons un brusque abaissement de la quantité de bactéries dans les leucocytes. Dès ce moment et jusqu'à la fin de la maladie, les bactéries englobées se trouvent presque exclusivement dans les macrophages.

Les bactéries que nous rencontrons dans le foie pendant tous les stades de la maladie se présentent à des états très différents. A côté des bactéries tout à fait normales, nous en trouvons d'autres qui, en conservant encore leur forme, présentent quelques anomalies : tantôt elles sont plus ou moins amincies ou raccourcies, tantôt leurs contours et leur coloration sont plus ou moins irréguliers (bactéries en voie de dégénérescence). Enfin nous trouvons des bactéries complètement dégénérées. Les bactéries normales, qui constituent la presque totalité de celles qu'on trouve dans le foie immédiatement après l'injection, deviennent de plus en plus rares, de sorte que pendant la période stationnaire elles ne font qu'une très petite fraction du nombre total. Ainsi, par exemple, dans le stade 9e (11 heures après l'injection), nous ne trouvons que 2 0/0 de bactéries normales ; toutes les autres sont en voie de dégénérescence plus ou

moins manifeste. En comparant la quantité totale de bactéries qu'on trouve pendant ce stade (0,8 bactéries sur 10 champs de vision) avec la quantité maxima que nous avons trouvée sept minutes et demie après l'injection (43 bactéries sur 10 champs de vision), nous pouvons évaluer facilement que, pendant onze heures de séjour des bactéries dans le foie, il ne reste à l'état normal que 1/2,500 de leur nombre primitif. Depuis les derniers stades de la période stationnaire, le pourcentage des bactéries normales commence à augmenter; cette augmentation progressive dure pendant toute la troisième période de la maladie, de sorte que, pendant les stades qui précèdent immédiatement la mort de l'animal, presque toutes les bactéries sont déjà tout à fait normales : le pourcentage de bactéries dégénérées est presque impossible à déterminer.

Nous voyons, d'après la description donnée, que les stades médians de la période stationnaire (9ᵉ stade et stades voisins) doivent être considérés comme ceux où l'organisme a fait de son mieux dans la lutte avec les bactéries, et après lesquels la maladie commence à devenir de plus en plus grave. Cette aggravation se manifeste par l'accroissement du nombre total de bactéries et du pourcentage de bactéries normales. Mais elle devient encore plus manifeste, si nous comparons les formes des bactéries normales du commencement et de la fin de la période stationnaire. Tandis que les bactéries du commencement de cette période sont tout à fait semblables à celles qui ont été injectées et que nous trouvons immédiatement après l'injection, les bactéries de la fin se présentent parfois sous forme de longs filaments, comme le montrent par exemple les figures 7 et 8, qui correspondent au premier stade de la troisième période (16ᵉ stade — quinze heures après l'injection) : ici les bactéries sont évidemment en état de multiplication. Cette forme des bactéries, très rare pendant les derniers stades de la période stationnaire, devient, pendant la troisième période, de plus en plus nombreuse, et se trouve à la fin de la maladie la forme prédominante ou même presque unique.

Les bactéries normales se trouvent englobées tantôt par les macrophages hépatiques, tantôt par les globules blancs, sans qu'il soit possible de déterminer dans quelles cellules elles se trouvent d'une manière prédominante. Seulement, dès la fin de

la période stationnaire, où la quantité de bactéries englobées par les leucocytes diminue brusquement, la quantité de bactéries normales dans les leucocytes diminue aussi : presque toutes les bactéries (sauf les bactéries libres) sont à présent englobées par les macrophages. En ce qui concerne les bactéries dégénérées, nous remarquons, pendant toute la marche de la maladie, une prédominance manifeste des bactéries englobées par les macrophages, ce qui est complètement d'accord avec la conclusion que nous avons tirée précédemment : à savoir que les macrophages hépatiques sont beaucoup mieux appropriés que les leucocytes pour la lutte avec les bactéridies.

Voilà les faits principaux relatifs aux bactéries, pendant toute la marche de la maladie. Avant de pousser plus loin, je crois utile d'essayer d'expliquer les phénomènes observés. Quoique les faits dont nous disposons jusqu'à présent soient encore peu nombreux, leur explication est néanmoins possible, surtout si nous avons en vue ce que donne l'étude des autres organes que nous ferons dans les chapitres suivants. Au cours de cette explication, nous aurons encore l'occasion de mentionner quelques faits qui ne pouvaient pas trouver une place convenable dans la description précédente.

Le fait le plus caractéristique de la première période de la maladie, c'est une diminution progressive et régulière du nombre de bactéries dans le foie. D'après tous les faits décrits jusqu'ici, nous pouvons affirmer que cette diminution est due à leur destruction, soit par les macrophages hépatiques, soit par les globules blancs. D'après notre courbe du nombre total de bactéries dans le foie, nous pourrions penser que la destruction des bactéries devient de plus en plus pénible. Mais cette conclusion est loin d'être fondée. Il doit se produire un ralentissement dans la destruction des bactéries (les bactéries qui ne sont pas encore détruites à un moment donné doivent être en général plus résistantes), mais il est toutefois beaucoup moins considérable que ne le fait voir notre courbe. En effet, il est invraisemblable que l'afflux des bactéries dans le foie ne dure que jusqu'au moment où nous y trouvons le maximum de leur nombre (sept minutes et demie après l'injection). Tout au contraire, nous verrons, dans la suite, que cet afflux se prolonge pendant toute la marche de la maladie, en s'effectuant presque exclusivement par les leucocytes

chargés de bactéries. Ainsi les bactéries que nous trouvons pendant un stade donné se composent : *a*) de bactéries qui y sont depuis le moment où leur nombre dans le foie était maximum, et *b*) de toutes les bactéries qui ont été transportées dans le foie plus tard, jusqu'au moment de l'observation, et dont la destruction n'est pas encore accomplie. Il est évident que les bactéries *b*, en augmentant le nombre total de bactéries sur chaque stade, doivent masquer considérablement la vitesse de leur destruction.

Ainsi nous pouvons nous faire une idée assez précise au sujet des phénomènes qui se passent dans le foie pendant la première période de la maladie. Les bactéries injectées et encore libres, emportées par le courant sanguin à travers le foie, y sont englobées directement par les macrophages, qui s'emparent aussi d'une quantité plus ou moins grande de bactéries apportées par les leucocytes. Ce phénomène d'élimination des bactéries du sang circulant par le foie dure tant que se produit l'afflux des bactéries dans le foie. En même temps, la destruction rapide des bactéries s'opère sans cesse et les rend en peu de temps complètement invisibles. Il est compréhensible que, de ces deux processus simultanés, doivent résulter des variations du nombre de bactéries pareilles à celles de notre courbe.

En ce qui concerne la période stationnaire de la maladie, nous pouvons la considérer, d'après tout ce que nous venons de dire, comme une période d'équilibre mobile entre les quantités de bactéries apportées et détruites dans le foie pendant un temps donné. Il me semble que c'est là la seule manière de voir, d'après les faits que nous avons observés pendant cette période. En effet, nous avons vu que la quantité de bactéries normales est ici toujours très petite : presque toutes les bactéries sont en état de dégénérescence marquée. Si nous considérons la vitesse extrême avec laquelle les bactéries dégénérées deviennent invisibles, nous ne pourrons expliquer la constance du nombre de bactéries, qui caractérise la période stationnaire, qu'en admettant qu'il y a un afflux constant de bactéries nouvelles, remplaçant aussitôt celles qui sont détruites. Par conséquent, beaucoup des bactéries qu'on trouve à chaque stade doivent être considérées comme apportées dans le foie immédiatement avant l'observation. Le fait qu'une grande partie des bactéries qu'on

rencontre sur les préparations, pendant la période stationnaire, se trouvent dans les leucocytes, est aussi complètement d'accord avec cette manière de voir : étant donné la grande rapidité d'englobement des bactéries, nous devons admettre que les bactéries libres n'existent pas dans le sang pendant cette période, et que celles qui sont apportées dans le foie par le courant sanguin y sont transportées par les leucocytes.

Dans notre description, nous avons tenté d'évaluer quelle fraction des bactéries arrêtées par le foie reste à l'état normal. En comparant le nombre maximal de bactéries qu'on trouve immédiatement (sept minutes et demie) après l'injection, avec la quantité de bactéries normales pendant le 9e stade de la maladie (onze heures après l'injection, milieu de la période stationnaire), nous avons conclu qu'il ne reste à ce moment à l'état vivant que 1/2,500 de la quantité primitive. Nous voyons à présent que cette conclusion n'est pas exacte. D'un côté, la quantité *maxima* de bactéries trouvées pendant un stade quelconque ne peut être considérée comme une mesure exacte de la quantité *totale* de bactéries arrêtées par le foie (cette dernière peut beaucoup dépasser la première); d'un autre côté les bactéries normales que nous trouvons dans les différents stades de la période stationnaire ne sont pas nécessairement les résidus de celles à qui nous avons eu affaire auparavant, mais elles ont pu être transportées dans le foie immédiatement avant le moment de l'observation. Nous voyons donc que la quantité de bactéries restées dans le foie à l'état vivant ne peut être que presque infiniment petite. Il est plus probable qu'il ne reste pas du tout de bactéries vivantes dans le foie, tant que cet organe conserve encore son état normal, et que *toutes les bactéries, arrêtées par le foie, y sont inévitablement détruites*. A ce point de vue, le foie du lapin est un organe, pour ainsi dire, naturellement immunisé contre les bactéries charbonneuses.

Cette immunité du foie ne dure pas pendant toute la maladie. Dès la troisième période, elle est déjà plus ou moins troublée, comme le démontrent les formes des bactéries, qui se trouvent évidemment à l'état de multiplication rapide. Mais, en nous appuyant sur les faits qui seront décrits dans les autres chapitres de notre article, nous pouvons démontrer facilement que ce trouble n'est pas aussi grand qu'on pourrait le croire d'après les tableaux microscopiques. Nous verrons notamment que, pen-

dant les derniers stades de la période stationnaire, et surtout pendant la troisième période de la maladie, les bactéries transportées dans le foie par le courant sanguin changent complètement d'aspect; au lieu d'être englobées par les leucocytes, elles sont libres et en voie de multiplication rapide. Outre cela, le nombre de bactéries transportées augmente de plus en plus. Nous pouvons alors comprendre la présence dans le foie de bactéries en voie de multiplication, au moins pendant les premiers stades de la troisième période de la maladie, sans qu'il soit nécessaire d'admettre que les macrophages hépatiques soient plus ou moins affaiblis. En effet, il n'est pas rare de trouver des bactéries qui, d'après leur aspect, étaient certainement auparavant à l'état de multiplication, et qui se trouvent néanmoins complètement détruites dans l'intérieur des macrophages. La figure 9 (pl. II) nous présente un cas pareil. Que le foie continue de détruire les bactéries avec succès, cela est aussi démontré par le pourcentage encore relativement grand de bactéries dégénérées. Que ce pourcentage soit moins considérable que pendant les stades précédents, cela s'explique suffisamment par l'augmentation de la quantité de bactéries normales transportées dans le foie.

On peut donc affirmer qu'il n'y a eu multiplication des bactéries dans l'intérieur des macrophages que lorsque leur nombre y est trop grand pour qu'on les suppose apportées par le courant sanguin. Or, des cellules pareilles ne se trouvent qu'exceptionnellement pendant les derniers stades de la période stationnaire et les premiers stades de la troisième période de la maladie. Les macrophages remplis de bactéries n'apparaissent que vers le milieu de cette troisième période, lorsque les bactéries commencent évidemment à rester maîtresses du champ de bataille, comme le démontrent par exemple les figures 10 et 11, qui correspondent au 20e stade de la maladie (vingt-sept heures et demie après l'injection). Les tableaux de ce genre deviennent vers la fin de la maladie de plus en plus fréquents. Mais il est facile de démontrer que, même alors, la majorité des bactéries qu'on trouve dans le foie proviennent de celles qui ont été transportées par le courant sanguin. En étudiant notamment nos préparations sous un faible grossissement, nous remarquons tout de suite que les bactéries sont distribuées dans l'organe d'une manière singulière : elles sont concentrées de préférence autour des lobules hépa-

tiques, et leur nombre diminue progressivement vers les veines centrales où, dans la plupart des cas, nous n'en trouvons point. Ce mode de distribution des bactéries s'observe même dans le foie du lapin qui a succombé vingt-huit heures et demie après l'inoculation. Il est évident qu'une distribution pareille ne peut être expliquée que par la faculté du foie d'arrêter toutes les bactéries qui y sont transportées par le sang.

Mais si le foie continue d'arrêter les bactéries, il ne les détruit plus; les bactéries se multiplient sans obstacles dans l'intérieur des macrophages qui les ont englobées. Les macrophages, envahis par les bactéries, périssent en ne laissant que des débris difficilement reconnaissables, et les bactéries, devenues libres et se multipliant tantôt dans les vaisseaux capillaires, tantôt dans le sang des vaisseaux d'un plus grand calibre, nous donnent les tableaux bien connus du foie des animaux ayant succombé au charbon. Il est bon de signaler que les leucocytes, très abondants à ce moment dans le foie au milieu des bactéries, ne contiennent que très rarement des bactéries englobées.

Tous ces phénomènes conduisent évidemment à une issue funeste. Les bactéries remplissent le foie quand l'animal meurt.

Modifications histologiques. — Pour terminer cette étude du foie il me reste encore à exposer les modifications histologiques qui caractérisent toute la marche de la maladie.

Je commencerai par les macrophages hépatiques.

En étudiant les préparations du lapin tué sept minutes et demie après l'injection, nous avons déjà fait connaissance avec les différentes formes de ces cellules. Nous avons dit aussi que les mêmes tableaux se répètent pendant toute la marche de la maladie, avec quelques modifications plus ou moins importantes. Une de ces modifications consiste en ce que, pendant les stades où le nombre de bactéries dans le foie est devenu très petit, la plupart des macrophages hépatiques n'en contiennent plus. Il est évident que les bactéries englobées auparavant ont été complètement détruites. Cette conclusion est d'autant plus nécessaire que nous trouvons toujours des macrophages avec les bactéries à un si haut degré de dégénérescence, qu'elles sont à peine reconnaissables.

En ce qui concerne la quantité de macrophages hépatiques

aux différents stades de la maladie, elle varie peu. Ces cellules se trouvent chez tous nos animaux, et toujours en quantité relativement faible. Leur nombre augmente un peu seulement vers le commencement de la troisième période de la maladie, par suite d'une augmentation parallèle du nombre de bactéries. Vers la fin de la maladie, leur nombre diminue de nouveau, probablement parce qu'elles ont été à présent détruites par les bactéries. Les macrophages simples, c'est-à-dire les cellules endothéliales peu modifiées, se trouvent, pendant les premières dix minutes après l'injection, en quantité très considérable. Ensuite, leur nombre décroît au fur et à mesure de la diminution de la quantité de bactéries; ce qui nous laisse conclure que les petites modifications subies par ces cellules disparaissent promptement après la destruction complète des bactéries englobées. A la troisième période de la maladie, la quantité de macrophages simples augmente de nouveau pour subir, vers la fin de la maladie, une diminution nouvelle, qui est due probablement aussi à la destruction des cellules par des bactéries en voie de multiplication rapide.

Je dois dire encore quelques mots au sujet de la quantité du pigment, qu'on trouve dans l'intérieur des macrophages. Nous avons vu précédemment qu'il est déjà très abondant chez le lapin tué sept minutes et demie après l'injection; il est encore plus abondant chez le lapin tué dix minutes après l'inoculation. Nous observons chez ce lapin un phénomène très intéressant : le pigment qui, pendant le stade précédent, était entièrement enfermé dans les macrophages, se trouve à présent aussi dans les cellules hépatiques. Pendant le stade suivant, c'est-à-dire chez le lapin tué quinze minutes après l'injection, la quantité de pigment est devenue déjà beaucoup moins considérable; et plus tard (vingt minutes), nous n'en trouvons que des quantités très faibles. Pendant la marche ultérieure de la maladie, nous trouvons le pigment dans les macrophages et dans les cellules hépatiques, en quantité toujours relativement petite et en même temps très variable. Seulement, vers le commencement de la troisième période de la maladie, nous observons une augmentation considérable de sa quantité, de sorte que les tableaux que nous trouvons ici peuvent être mis à côté de ceux que nous observons dans les premiers stades suivant immédiatement l'injection.

Vers la fin de la maladie, la quantité de pigment diminue considérablement.

Quelle signification peut-on attribuer à l'apparition du pigment dans les macrophages et dans les cellules hépatiques? Nous ne pouvons pas répondre à cette question. Il est seulement évident que la destruction des globules rouges dans les macrophages, le transport des grains de pigment, formés à la suite de cette destruction, dans les cellules hépatiques, ainsi que leur disparition rapide de l'intérieur de ces dernières, tout cela nous prouve qu'après l'injection des bactéries, le foie devient le siège de processus chimiques très intenses. L'augmentation de volume des cellules hépatiques, observée sur plusieurs stades, plaide aussi en faveur de cette conclusion. Il est probable que les substances nocives pour les bactéries, qui aident aux cellules à lutter contre les bactéries avec un si grand succès, sont élaborées dans le foie à la suite de ces processus.

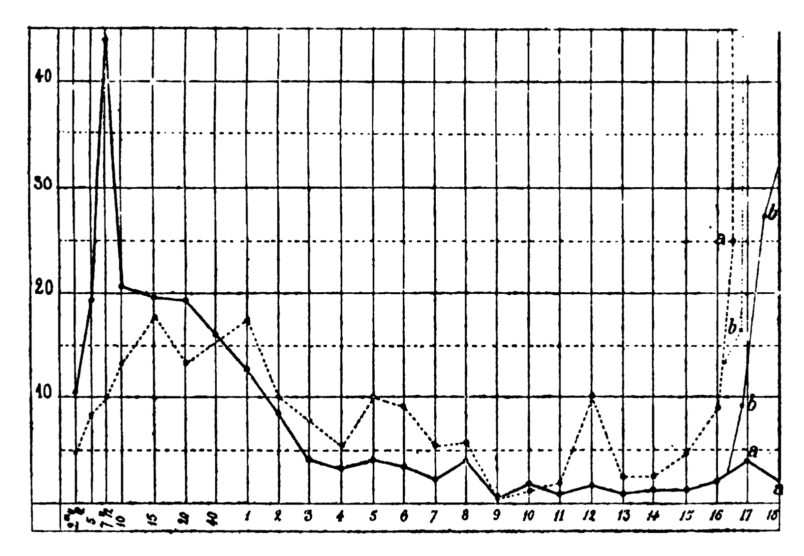
Pour finir cet exposé, il ne me reste qu'à mentionner les variations du nombre des leucocytes qu'on trouve dans le foie pendant les différents stades. En ce qui concerne les détails, je renverrai le lecteur à l'Appendice, et je dirai seulement que le premier maximum du nombre de leucocytes coïncide strictement avec le maximum du nombre de bactéries dans le foie, c'est-à-dire qu'on l'observe sept minutes et demie après l'injection. Leur nombre diminue ensuite rapidement, pour s'élever de nouveau vers la première heure après l'injection. Dès ce moment, la quantité de globules blancs, en présentant des variations irrégulières et très considérables, reste toujours plus ou moins élevée. Pendant le premier maximum du nombre de leucocytes, leur distribution dans le foie est très irrégulière : tantôt nous ne trouvons presque pas de leucocytes, tantôt ils abondent dans les vaisseaux capillaires et interlobulaires, en formant des agglomérations parfois très considérables. Pendant ce temps nous ne trouvons, sur les coupes des grands vaisseaux, presque pas de leucocytes, ce qui nous prouve que ces derniers se sont en effet arrêtés dans le foie. Pendant les stades plus éloignés, la distribution des globules blancs change considérablement. Nous les trouvons à présent partout : ils abondent et dans les vaisseaux capillaires et dans les vaisseaux interlobulaires et, enfin, dans le sang des grands vaisseaux du foie. Il est évident qu'il s'agit à présent d'une leu-

cocytose générale, développée sous l'influence des bactéries injectées. Cette leucocytose, bien marquée pendant toute la maladie, s'accentue surtout vers sa fin, où nous trouvons parfois les vaisseaux bourrés de leucocytes.

Je passe à présent à la description des phénomènes dans la rate.

II. — PHÉNOMÈNES DANS LA RATE.

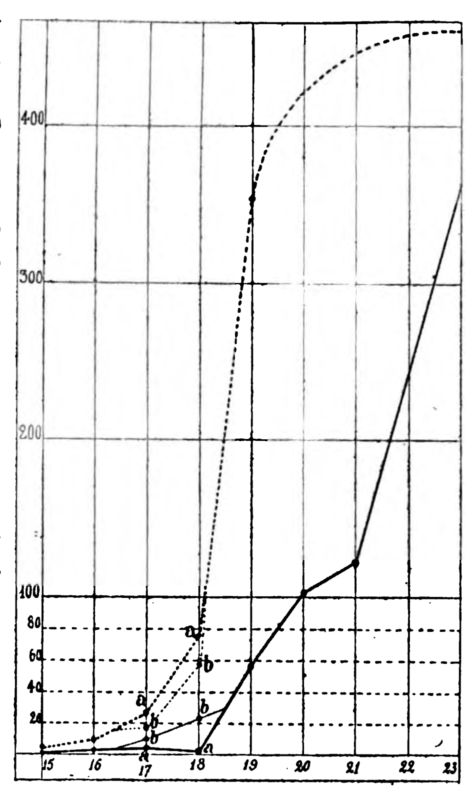
Je commencerai en donnant la courbe du nombre de bactéries trouvées dans la rate pendant toute la marche de la maladie. Pour pouvoir mieux préciser les différences qu'on observe à ce sujet entre le foie et la rate, je présente en même temps de nouveau la courbe du nombre de bactéries dans le foie. Cette dernière est représentée par une ligne continue et la première par une ligne pointillée.



Nous voyons par ces courbes que la marche de la maladie, d'après le nombre de bactéries dans la rate, peut être aussi divisée en trois périodes bien distinctes, correspondant complètement à celles que nous avons établies auparavant d'après le nombre de bactéries dans le foie. Néanmoins, nous observons ici beaucoup de différences dans toutes les périodes.

En ce qui concerne la première, nous remarquons que le

nombre de bactéries s'accroît dans la rate beaucoup moins vite que dans le foie, immédiatement après l'injection : le maximum n'est atteint que quinze minutes après, au lieu de sept minutes et demie dans le foie. En outre, ce maximum est beaucoup moins élevé. Ce maximum atteint, le nombre de bactéries ne diminue pas rapidement comme dans le foie, mais reste plus ou moins élevé, de sorte que, pendant le premier stade (une heure après l'injection), le nombre de bactéries dans la rate est déjà plus considérable que dans le foie. Dès ce moment commence la diminution progressive de la quantité de bactéries, qui surpasse cependant toujours la quantité correspondante dans le foie. Pendant la période stationnaire (depuis le 5e jusqu'au 15e stade), nous observons dans la rate des variations assez considérables du nombre de bactéries, qui reste toujours (sauf les 9e et 10e stades) au-dessus de celui du foie. La troisième période de la maladie est caractérisée par une brusque augmentation du nombre de bactéries, qui deviennent innombrables en peu de temps. Il est bon d'observer que les bactéries sont déjà très abondantes dans la rate, quand dans le foie elles sont encore presque aussi rares que pendant la période stationnaire. Pour permettre au lecteur de se faire une idée de la marche relative de l'accroissement du nombre de bactéries dans le foie et dans la rate pendant cette troisième période de la maladie, je donne ci-contre des courbes que j'ai construites sur une échelle beaucoup plus petite que les courbes précédentes.



Nous voyons, par ces courbes, que l'augmentation du nombre de bactéries, qui commence dans la rate beaucoup plus tôt que dans le foie, suit en même temps une marche beaucoup plus rapide, de sorte que la différence entre les nombres de bactéries dans le foie et dans la rate augmente de plus en plus. Seulement, vers la fin de la maladie, quand le nombre de bactéries semble être devenu constant dans la rate et continue à augmenter dans le foie, cette différence s'efface un peu, mais elle reste encore bien accentuée.

Nos courbes nous montrent aussi pourquoi il était nécessaire de représenter les stades 17 et 18 par deux animaux : les lapins *b* ont montré dans leur foie beaucoup plus et dans leur rate beaucoup moins de bactéries que les lapins *a*. Il est évident que ces lapins ne pouvaient pas être rangés parmi les autres, et devaient occuper une place spéciale.

Les bactéries que nous trouvons dans la rate pendant la première période de la maladie sont toutes englobées par les cellules (leucocytes et cellules de la pulpe); en tout cas, nous ne trouvons pas de bactéries qui soient sûrement libres. A cet égard les phénomènes dans la rate concordent complètement avec ceux du foie. Mais, pendant la période stationnaire, contrairement à ce que nous savons pour le foie, nous trouvons déjà, dès les premiers stades, des bactéries sûrement libres. Ces bactéries pourtant ne sont pas nombreuses : elles ne font toujours qu'une minorité du nombre total de bactéries dans la rate. Dès la troisième période de la maladie, le nombre de bactéries libres augmente rapidement. Quoique les bactéries libres se trouvent à présent aussi dans le foie, leur nombre dans la rate est, pendant tous les stades, beaucoup plus considérable.

Immédiatement après l'injection, presque toutes les bactéries se trouvent dans la pulpe de la rate, et seulement une quantité relativement très petite est englobée par les leucocytes. Par la suite, le nombre de bactéries dans les leucocytes augmente de plus en plus, de sorte que, 20 minutes après l'injection, nous trouvons déjà la majorité des bactéries dans l'intérieur des globules blancs. Dès ce stade, le pourcentage des bactéries dans les leucocytes reste toujours très élevé pendant les deux premières périodes de la maladie. Dès le dernier stade de la période stationnaire, nous trouvons, dans la rate ainsi que dans le foie, un abais-

sement brusque du nombre de bactéries dans les leucocytes. Pendant la troisième période, leur nombre devient tout à fait minime.

Nous trouvons déjà très tôt, dans la rate ainsi que dans le foie, les bactéries en état de dégénérescence plus ou moins manifeste. Mais leur nombre, surtout pendant la première heure après l'injection, est toujours beaucoup moins considérable que dans le foie. Pour mieux comparer les phénomènes dans ces deux organes, il est plus avantageux de recourir à la comparaison du nombre de bactéries normales, c'est-à-dire des bactéries qui ont échappé au pouvoir bactéricide des cellules. Le nombre de ces bactéries, pendant la première période, est toujours plus grand dans la rate, mais la différence en général n'est pas encore bien marquée : elle ne le devient que pendant la période stationnaire. Nous savons déjà que, pendant cette période, le pourcentage des bactéries normales dans le foie est toujours petit et parfois même très petit. Dans la rate, au contraire, il est toujours plus ou moins élevé. Ainsi, en calculant le pourcentage moyen pour tous les stades de la période stationnaire, nous trouvons pour le foie et pour la rate les nombres suivants : 10,7 0/0 de bactéries normales dans le foie et 33,4 0/0 dans la rate. Pendant la troisième période de la maladie, nous observons, dans la rate ainsi que dans le foie, une augmentation de la quantité relative de bactéries normales, mais cette quantité est toujours beaucoup plus élevée dans la rate.

Les bactéries normales se trouvent tantôt dans les cellules et tantôt elles sont complètement libres. *Toutes les bactéries libres sont toujours à l'état normal*, il n'y a pas parmi elles de bactéries dégénérées. *Les bactéries dégénérées se rencontrent au contraire toujours dans l'intérieur des cellules*, soit dans les cellules de la pulpe splénique, soit dans les leucocytes. Il est bon de signaler que nous trouvons la majorité des bactéries dégénérées dans l'intérieur des leucocytes, contrairement à ce que nous avons vu pour le foie, où elles se trouvent principalement dans les macrophages hépatiques. Ainsi les leucocytes doivent être considérés comme des éléments plus appropriés pour la lutte avec la bactéridie que les cellules de la pulpe splénique. Seulement, vers la troisième période de la maladie, où les leucocytes cessent d'englober les bactéries, le nombre de bactéries dégénérées dans les globules blancs s'abaisse rapidement.

D'après la description donnée, nous voyons que les phénomènes dans la rate sont pour l'organisme beaucoup moins bénins que les phénomènes correspondants dans le foie : dans la rate, le nombre total de bactéries ainsi que le pourcentage de bactéries normales est toujours beaucoup plus considérable. Le caractère plus dangereux des phénomènes dans la rate ressort encore mieux de l'étude des formes et de la distribution des bactéries dans cet organe.

Bactéridies. — Pendant la première période de la maladie, toutes les bactéries sont englobées par les cellules et sont disséminées assez régulièrement dans le tissu de l'organe. Mais, dès le commencement de la période stationnaire, à côté de ces bactéries, nous en trouvons d'autres avec des caractères tout à fait particuliers. Tandis que, sur toute la préparation, les bactéries sont en général distribuées par unités dans l'intérieur des cellules, nous rencontrons çà et là des bactéries disposées par groupes, contenant souvent plusieurs individus. Ce sont des filaments polyarticulaires plus ou moins longs et parfaitement colorés. Plusieurs de ces bactéries sont sûrement libres. Le lecteur peut se faire une idée des différentes formes de ces groupes de bactéries par nos figures 12 à 18 (pl. I et III), qui sont dessinées d'après les tableaux trouvés pendant les différents stades de la période stationnaire.

Ces tableaux démontrent nettement une multiplication, sous forme de centres isolés, des bactéries dans la rate. Cette multiplication caractéristique, pour toute la période stationnaire de la maladie (parmi les stades de cette période, seul le neuvième ne m'a présenté aucun centre de multiplication), commence déjà probablement pendant la première période. Du moins j'ai réussi à trouver un centre pareil pendant le troisième stade (fig. 15, pl. III). En ce qui concerne la fréquence de ces centres pendant la période stationnaire, je dois faire remarquer que nous observons à ce sujet des variations très considérables. Pendant quelques stades nous en trouvons quelques-uns sur chaque préparation, tandis que pendant les autres il faut chercher sur deux, trois préparations, pour en trouver un. En outre, pendant quelques stades, ils sont plus ou moins compliqués, et pendant les autres ils ne contiennent que quelques bactéries.

Dans les cas où les centres de multiplication sont très fréquents, ils sont aussi plus compliqués, et *vice versa*.

Quel est l'origine de ces centres de multiplication? D'après quelques tableaux microscopiques que j'ai réussi à observer, ce qui me semble le plus probable, c'est qu'ils sont dus à la multiplication des bactéries dans l'intérieur des cellules de la pulpe splénique. Du moins, nous trouvons parfois ces centres enfermés dans une cellule unique, comme, par exemple, dans les figures 16 et 24 (pl. III). Ensuite nous rencontrons des bactéries en voie de multiplication dans des cellules dont les noyaux sont déjà à peine visibles (voir fig. 19, pl. III), et enfin nous voyons des amas de bactéries qui, d'après leur disposition, paraissent avoir été enfermées dans l'intérieur d'une cellule à présent complètement détruite (voir fig. 23, pl. III). Ces tableaux nous laissent facilement reconstituer toute la marche du développement des centres de multiplication : les bactéries, enfermées dans une cellule quelconque de la pulpe splénique, se multiplient, détruisent la cellule et, mises en liberté, deviennent le point de départ de multiplications plus compliquées.

Je dois avouer que des tableaux aussi nets que les précédents sont très rares, mais les cellules de la pulpe splénique à contours bien nets ne sont pas moins rares. Des tableaux tout à fait identiques aux précédents, avec cette différence toutefois que les contours des cellules sont mal visibles, et que, par conséquent, la présence des bactéries dans leur intérieur ne peut pas être aussi bien démontrée, se trouvent au contraire partout. De plus, nous trouvons, sur chaque préparation, des cellules contenant dans leur protoplasma une bactérie normale plus ou moins allongée. On peut évidemment considérer ces tableaux comme les stades les plus précoces du développement des centres de multiplication des bactéries.

Vers la troisième période de la maladie, quand le nombre de bactéries dans la rate augmente rapidement, leur distribution, sous forme de centres de multiplication isolés, reste la même, mais ces centres contiennent à présent beaucoup plus de bactéries. Il n'est pas rare d'en trouver quelques-uns qui sont formés de cent et d'encore plus d'individus. En même temps le nombre de ces centres a aussi augmenté. Vers la fin

de la maladie, les centres isolés se confondent, et tout le tissu de la rate (sauf les corpuscules de Malpighi qui restent libres dans la plupart des cas) se transforme en un enchevêtrement continu des bactéries.

Je passe à présent aux modifications provoquées dans la rate par l'accumulation des leucocytes. Nous savons déjà, d'après mon article précédent, que cette accumulation se produit avec une vitesse extraordinaire : quelques minutes après l'injection, nous trouvons déjà des masses de globules blancs qui entourent les bactéries arrêtées dans cet organe. Le nombre de leucocytes dans la rate augmente d'abord rapidement, atteint son maximum environ après vingt minutes, et présente ensuite une série de variations irrégulières, en restant toujours sur des chiffres très élevés, qui s'élèvent encore de plus en plus avec la marche de la maladie. En comparant à ce sujet les phénomènes dans le foie et dans la rate, nous voyons que le nombre de globules blancs dans la rate est toujours, à tous les stades, beaucoup plus considérable que dans le foie.

Les leucocytes sont toujours groupés autour des bactéries. Mais c'est pendant la période stationnaire de la maladie que ce mode de distribution dans le tissu de la rate est le plus frappant, notamment là où les bactéries forment les centres de multiplication décrits ci-dessus: ces amas de bactéries sont parfois complètement parsemés de leucocytes, de sorte que le tissu même de la rate devient presque invisible. Les différents tableaux que nous observons ici sont représentés sur nos figures. Nous voyons que nous pouvons distinguer plusieurs stades dans les relations entre les globules blancs et les bactéries. Si le centre de multiplication des bactéries n'est pas grand, surtout s'il est constitué par des bactéries incluses dans une cellule, nous ne rencontrons pas ou presque pas de eucocytes (voir les fig. 13 et 18, pl. I et II). Si les centres de multiplication contiennent déjà plusieurs bactéries et surtout des bactéries libres, nous les trouvons alors toujours entourées par des leucocytes qui, dans quelques cas, se trouvent seulement dans le voisinage immédiat des bactéries (voir les figures 12, 14, 21, pl. I; II) et dans les autres cas pénètrent dans l'intérieur des centres de multiplication, séparant et isolant les bactéries qui

les constituent. Ce sont évidemment les différents stades d'un même processus, dont la signification nous deviendra claire un peu plus tard.

Les globules blancs qui entourent les bactéries d'un centre de multiplication sont vides pour la plupart, ce qui est tout à fait compréhensible, étant donnée la grande quantité de leucocytes qui s'accumulent autour d'une quantité de bactéries relativement petite. Mais nous en trouvons toujours quelques-uns qui ont englobé quelques bactéries. Leur nombre est petit, si les leucocytes n'ont pas encore pénétré dans l'intérieur du centre de multiplication, et croît au fur et à mesure que les bactéries sont de plus en plus éparses. Ainsi là où les centres de multiplication sont transformés en un groupe de bactéries isolées et éloignées les unes des autres, nous trouvons déjà presque toutes les bactéries dans l'intérieur des globules blancs (voir la fig. 17, pl. III).

Outre les leucocytes qui s'accumulent autour des centres de multiplication des bactéries, nous en trouvons encore beaucoup d'autres qui sont dispersés dans tout le tissu de la rate en quantité plus ou moins abondante. Parmi ces leucocytes, nous en trouvons quelques-uns qui contiennent dans leur intérieur des bactéries englobées. Ces dernières sont parfois tout à fait normales, mais, dans la plupart des cas, elles présentent les signes d'une dégénérescence plus ou moins complète. Il est remarquable que, parmi ces bactéries englobées et digérées dans le protoplasma des globules blancs, il y en ait quelques-unes qui, par leur longueur, rappellent tout à fait celles que nous rencontrons ordinairement dans les centres de multiplication (voir les fig. 25, 26 et 27, pl. III.)

La description donnée se rapporte à tous les stades de la période stationnaire. Pendant la troisième période de la maladie, nous rencontrons en général les mêmes tableaux, avec cette seule différence, qu'il devient à présent de plus en plus difficile de trouver des bactéries sûrement englobées par les leucocytes. Ces derniers s'accumulent dans la rate en quantité encore plus grande que pendant la période stationnaire; ils entourent les centres de multiplication des bactéries tout à fait comme auparavant, mais ils ont déjà perdu leur faculté d'englober les bactéries qui, ne rencontrant plus aucun obstacle pour leur

développement, se multiplient avec une rapidité extrême et amènent bientôt la mort de l'animal.

Modifications histologiques. — Passons à présent à l'étude des modifications de la structure histologique de la rate pendant toute la marche de la maladie, en ne nous arrêtant que sur celles qui sont les plus manifestes et qui semblent les plus importantes.

Une des modifications les plus frappantes est l'apparition dans la rate de grains de grandeur variable, qui se teintent de même que les noyaux des cellules, en bleu sur les préparations d'hématoxyline et en rouge sur celles de picro-carmin. Ces grains peuvent jusqu'à un certain degré se colorer par la méthode de Gramm, ce qui les fait encore ressortir davantage sur le fond plus clair de la préparation. La grandeur de ces grains, comme je l'ai déjà dit, est différente; les plus grands ont presque la même grosseur que les noyaux des leucocytes polynucléaires; les plus petits se présentent sous forme de points nettement colorés. Tous les grains, surtout les plus grands, ont des contours très nets et réguliers, et, par leur distribution, rappellent quelquefois beaucoup la distribution des noyaux dans des leucocytes polynucléaires. Il est souvent très difficile de déterminer la relation qui existe entre ces grains et les cellules de la rate; mais, dans la plupart des cas, on peut bien voir qu'ils ne sont pas libres, mais se trouvent dans l'intérieur de cellules qui, outre les grains, renferment encore parfois des globules blancs complètement normaux (voir les fig. 20 et 22, pl. III). Dans ces cas, nous trouvons dans l'intérieur d'une cellule toutes les formes intermédiaires entre les noyaux des leucocytes et les grains d'une grandeur différente. D'après ces tableaux, il n'est point douteux que les grains décrits ne sont autre chose que les résidus des noyaux des globules blancs détruits dans l'intérieur des cellules de la rate. Il est bon de signaler que les cellules qui contiennent ces grains ne renferment jamais de bactéries englobées.

Outre la destruction des leucocytes, nous trouvons aussi dans la rate des signes évidents de la destruction des globules rouges. Nous rencontrons notamment des cellules qui sont remplies de grains de pigment, colorés en brun ou brun jaunâtre. Ces grains ont, dans la plupart des cas, une forme plus ou moins irrégulière. Ils se trouvent soit dans les cellules particulières, soit dans

les cellules où se trouvent déjà les grains décrits ci-dessus, provenant de la destruction des globules blancs. Mais, contrairement à ce que nous avons vu auparavant pour le foie, la destruction des globules rouges est ici beaucoup moins marquée que la destruction des globules blancs.

Les phénomènes de destruction des leucocytes que je viens de décrire, ont pour nous un intérêt particulier, à cause de la vitesse extraordinaire avec laquelle ils se développent dans la rate : les grains, qui apparaissent déjà après deux minutes et demie, deviennent très nombreux cinq minutes après l'injection des bactéries. Dès lors nous les trouvons pendant tous les stades de la première période de la maladie, en quantité plus ou moins grande, mais sujette néanmoins à des variations considérables. Vers le commencement de la période stationnaire, ces grains disparaissent presque complètement, de sorte qu'on ne peut plus les trouver qu'en quantité minime jusqu'à la fin de la maladie.

Quelle est la signification de ces phénomènes ? Rappelons à ce sujet les phénomènes analogues, observés par M. Metchnikoff[1] pendant son étude sur l'érysipèle. Il a vu notamment que le rôle actif, dans la lutte avec les *streptococcus*, appartient exclusivement aux leucocytes, qui englobent et digèrent les microbes. En même temps, les cellules voisines du tissu conjonctif s'hypertrophient, et englobent une plus ou moins grande quantité de globules blancs, qui y sont bientôt détruits. Ces grands macrophages, dont la ressemblance avec nos cellules, contenant les débris des noyaux des globules blancs, est tout à fait frappante, sont, d'après M. Metchnikoff, les véritables balayeurs du champ de bataille : ils englobent et détruisent les globules qui sont devenus incapables de prolonger leur lutte avec les microbes. Il me semble probable que les faits que j'ai observés dans la rate doivent être expliqués de la même manière : les globules faibles, qui ne peuvent pas supporter les toxines bactériennes, sont détruits très vite, pour faire place à d'autres éléments plus forts. Il est alors compréhensible que les phénomènes de destruction des globules blancs ne s'observent qu'au début de la maladie : les globules blancs faibles une fois détruits, il ne reste plus dans l'organisme que des globules plus appropriés pour la lutte avec les bactéries.

1. *Virchow's Archiv*, B. 107, 1887.

En ce qui concerne les autres modifications du tissu de la rate, je mentionnerai seulement les phénomènes de la karyokinèse, que nous trouvons toujours pendant les deux premières périodes de la maladie à la périphérie des corpuscules de Malpighi, et l'augmentation de volume de ces corpuscules.

Marche des phénomènes. — Passons à présent à l'explication des phénomènes dans la rate. Ici, comme dans l'explication des phénomènes dans le foie, nous nous arrêterons tout d'abord sur le nombre de bactéries que nous trouvons dans la rate pendant toute la marche de la maladie.

En ce qui concerne la première période et notamment les stades qui suivent immédiatement l'injection, je veux rappeler tout d'abord une particularité qui a déjà été analysée dans mon article précédent. Cette particularité consiste en ce que les bactéries sont beaucoup moins nombreuses dans la rate que dans le foie. Sans entrer dans la discussion de ce fait, je ferai remarquer seulement que nous devons voir ici une adaptation très utile pour l'organisme : la rate qui est, d'après tout ce que nous ont appris les descriptions précédentes, relativement faible dans la lutte contre les bactéries, doit éviter autant que possible leur accumulation dans son tissu.

Les autres différences entre le foie et la rate, que nous avons observées pendant la première période de la maladie, s'expliquent suffisamment à mon avis aussi par la faiblesse relative de la rate envers les bactéries.

Ainsi nous pouvons facilement expliquer pourquoi le maximum du nombre de bactéries dans le tissu de la rate s'observe beaucoup plus tard que dans le foie. Les bactéries, dont l'afflux dans la rate, ainsi que dans le foie, doit se faire pendant toute la durée de la maladie, doivent s'accumuler de plus en plus dans cet organe jusqu'au moment où le nombre de bactéries détruites pendant un temps donné est égal au nombre de bactéries nouvellement retenues. Or, ce moment doit arriver d'autant plus tard que la destruction de bactéries est plus lente. Nous pouvons aussi expliquer de la même manière pourquoi, une fois le maximum atteint, le nombre de bactéries dans la rate ne diminue pas rapidement, mais reste, pendant quelque temps, approximativement à son niveau maximum (jusqu'à une heure après l'injection dans

notre cas). Dès ce moment, la destruction des bactéries dans la rate commence à se manifester par une diminution progressive de leur nombre jusqu'à la fin de la première période de la maladie.

Je dois faire remarquer d'ailleurs que la diminution du nombre de bactéries peut être encore en partie produite par une autre cause. Nous savons en effet que, pendant la première période de la maladie, il y a toujours dans la rate beaucoup de bactéries englobées par les globules blancs. Or ces globules sont complètement libres, et peuvent facilement, étant entraînés par le courant sanguin, abandonner la rate pour le foie. C'est probablement une des sources des bactéries qui, comme nous le savons déjà, sont sans cesse transportées dans cet organe pour y être définitivement détruites.

La destruction des bactéries dure aussi pendant toute la période stationnaire. En même temps il se produit une multiplication des bactéries qui, comme nous l'avons vu, détruisent les cellules de la pulpe où elles étaient enfermées et, devenant libres, composent les centres de multiplication si caractéristiques pour cette période. Mais si les bactéries commencent à se multiplier si tôt dans la rate, pourquoi n'envahissent-elles pas tout de suite cet organe? Pourquoi leur nombre reste-t-il pendant assez longtemps au même niveau? L'analyse des relations entre les bactéries et les globules blancs donne, à mon avis, une réponse tout à fait satisfaisante.

D'après les tableaux microscopiques, décrits précédemment, nous pouvons conclure que les leucocytes entourent toujours les centres de multiplication des bactéries, tout au moins si ces centres contiennent une quantité de bactéries assez considérable, qu'ils pénètrent dans l'intérieur de ces centres, et qu'après avoir écarté les bactéries isolées, ils les englobent avec une grande énergie. Ainsi, les bactéries qui composent les centres de multiplication deviennent plus ou moins complètement la proie des leucocytes, qui doivent être considérés comme des éléments plus adaptés que les cellules de la rate pour la lutte contre les bactéries.

Les bactéries englobées par les leucocytes sont en partie détruites dans la rate même. Cela est bien démontré par le fait que nous trouvons des bactéries dégénérées dans l'intérieur des leucocytes. Mais la rate se débarrasse encore par un autre pro-

cédé des leucocytes contenant des bactéries. Sur presque tous nos dessins, nous voyons bien nettement que les leucocytes contenant des bactéries se trouvent dans le voisinage immédiat des espaces sanguins de la rate. Ils peuvent très facilement être entraînés par le courant sanguin et alors se diriger vers le foie où les bactéries qu'ils contiennent seront détruites définitivement. Ainsi, il est possible pour l'organisme, grâce à l'action des leucocytes, de maintenir le nombre de bactéries dans la rate à un niveau relativement bas pendant un temps plus ou moins long (pendant toute la période stationnaire). Cela est d'autant plus possible que la quantité de leucocytes augmente beaucoup, qu'il se produit de la leucocytose, comme on peut en juger d'après les tableaux microscopiques qui nous montrent une grande abondance de globules blancs non seulement dans le tissu de la rate, mais aussi dans le sang circulant.

Vers la fin de la période stationnaire, comme nous le savons d'après la description donnée auparavant, l'énergie avec laquelle les globules blancs englobent les bactéries diminue considérablement, de sorte que le pourcentage des bactéries englobées devient de plus en plus petit. Quelle est la cause de cet affaiblissement des leucocytes dans leur lutte contre les bactéries ? Il est bien probable qu'on doit la chercher dans l'action des toxines bactériennes. Ces toxines, on les a déjà rendues responsables de l'absence de la phagocytose, qu'on a cru pouvoir affirmer dans le développement du charbon chez les animaux sensibles, comme la souris, le cobaye et le lapin. On a admis notamment que ces toxines exercent une action répulsive sur les leucocytes, qui cèdent la place aux bactéries, sans engager avec elles une lutte quelconque. Cette opinion, défendue surtout par M. Metchnikoff, doit être modifiée pour devenir conforme avec les faits réels. Nous pouvons bien admettre une action des toxines sur les leucocytes, se faisant lentement lorsque les toxines sont faibles, et plus vite quand elles sont très concentrées. Mais, même ici, nous ne pouvons plus parler d'une action répulsive quelconque, parce que les leucocytes continuent à se rassembler autour des bactéries en quantité de plus en plus grande ; nous devons supposer plutôt un état de paralysie, insuffisante pour empêcher les leucocytes de se diriger vers les bactéries, mais qui devient complète dans le voisinage immédiat des bactéries, où la con-

centration des toxines doit atteindre son plus haut degré. C'est pourquoi le globule blanc qui avait encore assez de force pour s'avancer jusqu'à contact immédiat avec la bactérie n'est plus maintenant capable de l'englober.

Quoi qu'il en soit, cet affaiblissement des leucocytes doit avoir pour l'organisme une signification fatale. Les bactéries, qui ne sont plus gênées par les globules blancs dans leur multiplication, envahissent bientôt tout le tissu de la rate, qui devient ainsi un des points de départ de l'infection de l'organisme, et notamment du foie où doivent se diriger toutes les bactéries qui sont entraînées de la rate par le courant sanguin. En effet, nous avons vu, dans notre chapitre précédent, que vers la fin de la période stationnaire et pendant toute la troisième période de la maladie, on trouve dans le foie les signes évidents d'un afflux considérable de bactéries libres, transportées dans cet organe par le courant sanguin. Nous voyons à présent qu'une des sources de ces bactéries est la rate, qui est jusqu'à la mort de l'animal de plus en plus envahie par les bactéries en voie de multiplication extrêmement énergique.

III. — PHÉNOMÈNES DANS LES POUMONS.

Je serai très court dans la description des phénomènes dans les poumons, parce que le matériel dont je dispose n'est pas grand. Outre deux lapins tués immédiatement (cinq et huit minutes) après l'injection, et dont les préparations ont déjà été décrites dans mon article précédent, je n'ai étudié les poumons que chez trois autres lapins qui ont été tués trois, sept et neuf heures après l'inoculation.

En ce qui concerne les stades qui suivent aussitôt l'injection, je rappellerai au lecteur que nous trouvons dans les poumons un nombre de bactéries très considérable, même plus considérable que dans le foie; la grande majorité des bactéries est déjà englobée par les leucocytes qui s'accumulent en grande abondance dans les vaisseaux capillaires. Dans une préparation du lapin tué huit minutes après l'injection, presque toutes les bactéries étaient enfermées dans l'intérieur des globules blancs. Les tableaux de ce genre ont pour nous une grande importance, parce qu'ils nous donnent une idée précise du procédé par lequel

se produit l'englobement des bactéries par les leucocytes. Dans mon article précédent, j'ai laissé cette question sans discussion, en me bornant seulement à faire remarquer que les leucocytes englobent les bactéries dans le sang même. D'après les tableaux que nous trouvons sur les préparations des poumons, il semble bien probable que cet englobement se produit de préférence dans les vaisseaux capillaires des poumons, où les bactéries, surtout les bactéries aussi grandes que la bactéridie charbonneuse, peuvent facilement s'arrêter quelques instants, grâce à des causes tout à fait mécaniques. Étant donnée la vitesse extraordinaire avec laquelle les leucocytes englobent les bactéries, ces quelques instants seront suffisants pour que les leucocytes du courant sanguin, attirés par les bactéries, s'arrêtent aussi auprès d'elles, les empêchent ainsi de poursuivre leur chemin au travers des vaisseaux capillaires et les englobent sur place. Comme ces leucocytes restent toujours complètement libres, ils peuvent facilement, après avoir englobé les bactéries, être entraînés par le sang circulant et transportés ailleurs. Par ce procédé, les poumons se débarrassent vite des bactéries, comme on peut en juger d'après les préparations du lapin tué trois heures après l'injection. Ici, nous ne trouvons en effet dans les poumons que relativement peu de bactéries, qui restent aussi dans les vaisseaux et sont toutes enfermées dans le protoplasma des globules blancs; les cellules du tissu même des poumons ne prennent aucune part dans la lutte. Plusieurs de ces bactéries se trouvent dans un état de dégénérescence plus ou moins marquée, ce qui prouve que, outre l'entraînement par le courant sanguin des globules blancs contenant des bactéries, les poumons se débarrassent aussi des bactéries par leur destruction sur place, par l'intermédiaire des leucocytes. Les signes d'une multiplication quelconque des bactéries font complètement défaut.

D'après les faits que je viens de décrire, il est donc facile de se faire une idée des phénomènes qui se passent dans les poumons pendant la première période de la maladie. La lutte contre les bactéries se produit ici exclusivement par l'entremise des leucocytes, qui, après avoir englobé les bactéries, les emportent avec le courant sanguin ou les détruisent sur place, de sorte que leur nombre dans les poumons diminue de plus en plus.

Ce qui se passe dans les poumons pendant la période station-

naire nous reste complètement inconnu, parce que les deux seuls animaux dont j'aie étudié les poumons, quoique tués relativement tôt après l'injection (sept et neuf heures), nous ont néanmoins donné dans le foie et dans la rate des tableaux de la maladie si avancée, que nous les avons rangés parmi les premiers stades de la troisième période. Nous trouvons notamment sur les coupes beaucoup de bactéries dont plusieurs se présentent sous forme de longs bâtonnets, composés de plusieurs articles, ce qui prouve que nous avons affaire ici à leur multiplication rapide. Parfois nous rencontrons des centres de multiplication tout à fait semblables à ceux de la rate. La plupart des bactéries sont tout à fait normales, le pourcentage des bactéries dégénérées est très petit. La quantité de globules blancs dans les poumons est très grande, mais les phénomènes de phagocytose sont beaucoup moins marqués que pendant les stades précédents : les centres de multiplication des bactéries sont composés pour la plupart par des bactéries libres ; les leucocytes englobent seulement les bactéries qui se trouvent isolées dans le tissu des poumons. En un mot, nous trouvons ici les signes évidents d'un affaiblissement des leucocytes, qui est si caractéristique pour la troisième période de la maladie. Il est évident que, pendant ces stades, les poumons représentent une source très puissante de l'infection par les bactéries du sang circulant.

IV. — MARCHE DE LA MALADIE

Le lecteur qui a suivi attentivement toutes les descriptions précédentes peut facilement reconstituer toute la marche de la maladie. Néanmoins, je veux faire ici cette reconstitution moi-même, pour attirer l'attention sur quelques points importants, pour lesquels je n'ai pas trouvé jusqu'ici de place convenable.

En nous appuyant d'abord seulement sur les phénomènes dans le foie et dans la rate, qui ont été le mieux étudiés, nous pouvons représenter toute la marche de la maladie de la manière suivante :

Les bactéries injectées dans le sang sont arrêtées principalement dans le foie où elles sont englobées par les macrophages hépatiques, soit directement, soit par l'intermédiaire des globules blancs. La rate n'arrête que relativement peu de bactéries. Tandis que dans le foie les bactéries sont tuées avec une éner-

gie extraordinaire, dans la rate le même processus se produit avec une lenteur beaucoup plus grande. Après un temps plus ou moins long, quelques-unes des bactéries de la rate, qui sont restées encore vivantes, commencent à s'accroître et à se multiplier. Alors s'engage une lutte entre ces bactéries et les globules blancs qui s'accumulent en grande abondance autour des bactéries, et qui, après les avoir englobées, les digèrent sur place ou les transportent dans le foie pour la destruction définitive. Ainsi se passent les choses pendant un temps plus ou moins long, pendant lequel les bactéries se multiplient sans cesse dans la rate et, transportées par les globules blancs dans le foie, sont sans cesse détruites dans ce dernier organe. Cet état d'équilibre mobile, pour ainsi dire, dure parfois très longtemps (plus de vingt heures dans quelques-unes de nos expériences) jusqu'à ce que les leucocytes commencent à s'affaiblir. Les bactéries, qui ne sont plus gênées par les leucocytes, se multiplient, passent à l'état libre dans le sang et infectent peu à peu le foie qui, après une lutte plus ou moins énergique engagée par ses macrophages, s'affaiblit à son tour. Les bactéries envahissent même le foie et provoquent bientôt la mort de l'animal.

Ces différentes phases de la maladie peuvent encore être exprimées d'une manière plus générale en recourant aux modifications fonctionnelles des cellules phagocytaires. Nous pouvons dire notamment que pendant la première période de la maladie, les trois espèces de cellules phagocytaires que nous avons étudiées (cellules de la pulpe splénique, leucocytes et macrophages hépatiques) se montrent très résistantes, de sorte que les bactéries qu'elles ont englobées sont gênées dans leur multiplication, ou même, dans la plupart des cas, périssent plus ou moins vite. Mais cette résistance de tous les phagocytes ne dure que pendant quelques heures. Ce sont les cellules de la pulpe splénique qui s'affaiblissent les premières et ne font plus obstacle à la multiplication des bactéries incluses dans leur protoplasma. Ainsi la maladie entre alors dans sa deuxième période, où la lutte contre les bactéries se prolonge à l'aide des leucocytes et des macrophages hépatiques. Cette lutte est assez efficace pour maintenir le nombre de bactéries à un niveau relativement bas. Après un temps plus ou moins long, les leucocytes sont affaiblis à leur tour. Dès ce moment

la multiplication des bactéries dans la rate et dans tous les organes se produit sans aucun obstacle, et les macrophages hépatiques, qui sont restés seuls à lutter d'une manière plus ou moins efficace, écrasés par le nombre des bactéries transportées sans cesse dans le foie par le courant sanguin, ne supportent cette lutte inégale que pendant un temps plus ou moins court, de sorte que les bactéries, maintenant victorieuses sur tous les champs de bataille, tuent vite l'organisme envahi.

Ainsi, la marche de la maladie nous démontre qu'il y a une gradation successive de la résistance des différentes cellules phagocytaires, ce qui détermine pour chacune d'elles le temps pendant lequel elles résistent aux bactéries. Mais pourquoi les cellules qui ont d'abord résisté aux bactéries perdent-elles ensuite cette faculté ? A ce sujet, nous ne pouvons faire que les deux suppositions suivantes.

Premièrement, nous pouvons admettre que la résistance des cellules est peu à peu réduite par l'action des toxines. Quoique pendant les deux premières périodes de la maladie, les bactéries soient détruites au fur et à mesure qu'elles se reproduisent, les toxines qu'elles ont déjà sécrétées restent dans l'organisme. Il est donc bien probable que les cellules s'affaiblissent de plus en plus sous l'influence de ces poisons. Cet affaiblissement doit se manifester chez les cellules phagocytaires dans l'ordre de leur résistance progressive, c'est-à-dire tout d'abord chez les cellules de la pulpe splénique, ensuite sur les leucocytes, et enfin sur les macrophages hépatiques. En un mot, la marche de la maladie devient suffisamment explicable par cette action prolongée des toxines.

Une autre supposition qui peut aussi bien expliquer la marche de la maladie consiste en ce que les bactéries deviennent de plus en plus virulentes. En effet, nous avons vu apparaître, pendant le développement de la maladie, un grand nombre de générations successives de bactéries. Presque toutes ces bactéries sont détruites par les phagocytes : il ne reste qu'une très petite quantité d'individus de chaque génération, qui servent de point de départ pour une nouvelle multiplication. Nous avons donc ici toutes les conditions pour l'action illimitée de la sélection naturelle, qui doit produire une race de bactéries de plus en plus appropriée à la lutte avec les cellules phagocytaires. Il est évident

que ce renforcement des bactéries mène aux mêmes résultats que l'affaiblissement progressif des phagocytes.

Quelle est la plus exacte de ces deux explications? Je ne puis le dire d'après mes recherches : ce qui me semble le plus probable, c'est que toutes les deux sont également exactes, et que la succession des phénomènes morbides est due en partie à l'intoxication des cellules et en partie à l'augmentation de la virulence des bactéries.

Il est évident que le tableau que je viens de tracer n'est pas complet, parce que nous n'avons considéré jusqu'ici que deux organes, le foie et la rate. Et cependant, il n'est point douteux que les autres organes prennent aussi une part plus ou moins importante au développement de la maladie. Quoique je ne puisse rien affirmer au sujet de ces organes que je n'ai point étudiés, je donnerai néanmoins quelques considérations qu'on ne doit prendre que comme un programme d'expériences ultérieures.

Notre choix du foie, de la rate et des poumons pour l'étude du développement du charbon a été heureux, parce que nous y avons trouvé des modes variés de la lutte avec les bactéries. Dans le foie, la lutte la plus efficace s'accomplit principalement à l'aide des macrophages hépatiques, c'est-à-dire des cellules qui entrent dans la constitution de cet organe ; l'action des cellules de la rate est beaucoup moins marquée, de sorte que là, le rôle principal dans la lutte appartient aux leucocytes ; enfin, dans les poumons, ce sont les globules blancs seuls qui défendent cet organe contre l'invasion des bactéries. Tous les autres modes de la lutte entre les cellules et les bactéries étant inconnus, nous pouvons admettre que dans tous les organes la lutte se produit d'une de ces trois façons.

En envisageant tous les organes, nous n'en trouvons pas un seul auquel nous puissions attribuer le même mode de lutte que dans le foie. C'est pourquoi nous pouvons admettre provisoirement que, dans les autres organes, la lutte se produit, soit comme dans la rate, soit comme dans les poumons. A la manière de la rate peuvent lutter seulement les organes qui possèdent des cellules phagocytaires, c'est-à-dire la moelle des os, les glandes lymphatiques et les amas de tissu lymphoïde que nous trouvons dispersés partout, et surtout dans les parois du canal digestif. Tous les autres organes se compor-

tent probablement comme les poumons. D'après ces suppositions, dans tous les organes et dans tous les tissus de l'organisme (sauf le foie), la lutte contre les bactéries se produit, soit principalement (rate, moelle des os, etc.), soit exclusivement (poumons et autres organes sans phagocytes propres) par les globules blancs.

Tout cela étant posé, nous sommes en état de compléter le tableau de la maladie que nous avons tracé.

En ce qui concerne la première période de la maladie, nous devons admettre que l'englobement des bactéries par les leucocytes se produit non seulement dans les poumons, mais aussi dans les réseaux capillaires de tout le corps, en un mot partout où les bactéries ont été mécaniquement arrêtées pour quelques instants : ces bactéries attirent tout de suite les leucocytes qui les englobent. Les leucocytes sont alors entraînés par le courant sanguin qui les amène tôt ou tard dans le foie, où les bactéries encore vivantes subissent une destruction définitive. Ainsi le foie doit être considéré comme l'organe central de la destruction des bactéries transportées par les globules blancs de tous les coins de l'organisme.

Le foie conserve aussi le même rôle d'organe central de la destruction des bactéries pendant la période stationnaire de la maladie. Nous avons vu que les bactéries qui commencent à présent à se multiplier dans la rate sont sans cesse transportées dans le foie par les globules blancs. Mais il est bien probable qu'il en vient aussi des autres organes. Il est tout à fait invraisemblable que tous ces organes puissent être complètement débarrassés de leurs bactéries pendant la première période de la maladie. Cela est surtout invraisemblable pour les organes qui possèdent des phagocytes propres : les bactéries, englobées par ces derniers, sont protégées contre les leucocytes et peuvent se multiplier de même qu'elles se multiplient dans la rate. Toutes ces bactéries doivent subir le même sort, c'est-à-dire elles doivent être transportées tôt ou tard dans le foie après avoir été englobées par les leucocytes.

Pendant la troisième période de la maladie, quand les leucocytes sont déjà partout affaiblis, la multiplication des bactéries dans tous les organes doit devenir de plus en plus énergique, de sorte que le foie, qui reçoit les bactéries de tous les côtés, perd

enfin sa résistance et l'animal meurt. Il se pose ici une question très intéressante, à savoir dans quel organe la victoire des bactéries se manifeste tout d'abord d'une manière décisive. Il semble que dans quelques cas cette première place appartienne à la rate. En effet, en nous arrêtant par exemple sur les résultats que nous avons observés chez notre lapin tué vingt heures après l'injection (18e stade, *a*), nous voyons que, tandis que le nombre de bactéries dans le foie est encore tout à fait insignifiant (2, 5 bactéries sur 10 champs de vision), leur nombre dans la rate est déjà assez considérable (74 bactéries sur 10 champs de vision). Il est impossible d'admettre ici que la multiplication des bactéries dans les autres organes soit aussi énergique que dans la rate, parce qu'alors le nombre de bactéries dans le foie, cette place centrale du transport de bactéries, devrait être plus considérable. Cette faiblesse relative de la rate doit-elle être considérée comme une règle générale ? On ne pourra le dire qu'après des recherches ultérieures.

Tout ce que nous venons de dire dans ce chapitre au sujet de la marche de la maladie ne se rapporte immédiatement qu'aux cas où l'inoculation de l'animal a été provoquée par une injection intraveineuse de bactéries. Mais comme les modifications anatomo-pathologiques que nous avons trouvées chez nos animaux sont les mêmes que celles qu'on trouve toujours chez les animaux ayant succombé au charbon, il est bien probable que la maladie suit la même marche dans tous les cas de charbon. La seule différence est que, dans le cas où la maladie commence par une lésion locale (comme par exemple après une inoculation sous-cutanée), les bactéries qui se multiplient à l'endroit de leur invasion primitive forment un centre d'infection qui agit pendant toute la marche de la maladie.

Pour finir, je répéterai encore une fois, pour éviter tous malentendus possibles, que tout ce que j'ai dit au sujet des autres organes (sauf ceux que j'ai étudiés directement) doit être considéré seulement comme un programme pour des recherches ultérieures. Quoique toutes les suppositions que j'ai faites soient très probables d'après nos connaissances actuelles sur le charbon, elles doivent être néanmoins encore prouvées d'une manière plus directe et plus précise.

V. — CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Il ne me reste à présent qu'à m'arrêter sur quelques questions d'ordre général, qui peuvent être rattachées plus ou moins directement aux résultats principaux de nos études. Ce sont les questions suivantes :

a) La théorie de la phagocytose ;
b) Le rôle de la rate dans les maladies infectieuses ;
c) La chimiotaxie des leucocytes.

a) *La théorie de la phagocytose*, fondée par les travaux de Metchnikoff, rencontre encore une opposition énergique du côté des savants allemands. Je crois que les bases de cette opposition sont bien ébranlées par les faits qne nous venons de faire connaître. Nous rencontrons en effet pendant tous les stades de la maladie les preuves évidentes d'une importance prédominante des phénomènes de phagocytose. Grâce à ces phénomènes, il devient possible pour l'organisme de se défendre pendant un temps plus ou moins long contre l'invasion des bactéries, et cette invasion n'a lieu que lorsque les phagocytes perdent leur faculté d'englober et de digérer les bactéries. Ces preuves sont, à mon avis, d'autant plus décisives qu'elles sont empruntées à l'étude de toute la marche de la maladie où, grâce à la connaissance exacte de la succession des phénomènes, il n'est plus possible de donner à ces derniers des interprétations différentes. L'importance de ces preuves augmente encore parce qu'elles sont fournies pour une maladie (le charbon chez le lapin), pour laquelle on niait l'existence de la phagocytose.

La théorie de la phagocytose attachant une grande importance à l'action des leucocytes, on objectait souvent qu'il n'est pas possible de trouver dans le sang circulant les bactéries dans l'intérieur des globules blancs, même quand elles sont injectées en grande abondance dans le sang. Cette objection, elle aussi, perd toute sa valeur par nos recherches. En effet, le sang circulant ne doit contenir qu'en très petite quantité des leucocytes avec des bactéries englobées : ces leucocytes restent dans le sang pendant un temps très court, nécessaire pour qu'ils soient trans-

portés dans le foie. Ce n'est donc que par un hasard heureux qu'on peut trouver, dans les préparations du sang, des leucocytes chargés de bactéries. Pour les trouver, on doit s'adresser à l'examen des coupes des organes.

b) Rôle de la rate dans les maladies infectieuses. — D'après les recherches de M. Metchnikoff[1] et Soudakewitch[2] sur la fièvre récurrente, et d'après les belles expériences de M. Bardach[3] et Soudakewitch[4] faites sur les animaux dératés, il semblait presque prouvé que la rate est l'organe central où l'organisme concentre toutes les bactéries pour les y détruire. Mes recherches démontrent que cette opinion n'est pas exacte, au moins pour le développement du charbon : la rate est un organe très faible dans la lutte avec les bactéries charbonneuses. C'est surtout le foie qui y manifeste une énergie éminente. Ainsi, si les preuves données en faveur du rôle protecteur de la rate étaient irréprochables, nous devrions admettre qu'il n'existe aucun plan général de la lutte de l'organisme contre les bactéries : cette lutte se produirait dans certains cas principalement par les uns, dans les autres cas par d'autres organes. Mais il me semble que ces preuves sont loin d'être satisfaisantes.

En ce qui concerne les expériences de M. Bardach et Soudakewitch, elles prouvent seulement que la marche de la maladie chez les animaux dératés est beaucoup plus grave que chez les animaux normaux. Il est évident que cela ne prouve pas du tout que la destruction des bactéries se produise principalement dans la rate : la gravité de la maladie peut être produite par des causes tout à fait différentes. Les fonctions physiologiques de la rate étant encore mal connues, il est impossible de préciser par quel procédé la présence de la rate détermine une marche plus bénigne de la maladie ; nous ne pouvons faire à ce sujet que des suppositions plus ou moins probables. Nous pouvons admettre, par exemple, que la rate, qui peut, par sa contraction, fournir très vite au sang un nombre considérable de jeunes formes de leucocytes, agit ici d'une manière tout à fait indirecte :

1. *Virchow's Archiv*. B. 109.
2. *Annales de l'Institut Pasteur*, t. V, 1891.
3. *Ibid.*, t. III, 1889, et t. V, 1891.
4. *Ibid.*, t. V, 1891.

les leucocytes et non la rate même détruiraient les bactéries [1].

Les preuves plus directes sont celles qui ont été citées par M. Metchnikoff et M. Soudakewitch dans leurs études sur la fièvre récurrente. Ils ont vu notamment qu'après la crise, quand les spirilles ont complètement disparu du sang, on ne les trouve nulle part, sauf dans la rate, qui les contient en grande abondance. Après quelques heures, ces bactéries sont complètement détruites. De ce fait, les auteurs mentionnés ont conclu que toutes les bactéries qui circulaient auparavant dans le sang sont transportées maintenant dans la rate pour y subir une destruction définitive. Il me semble que, d'après les faits précédents, cette conclusion n'est point nécessaire. Nous avons vu en effet que les bactéries charbonneuses, qui sont relativement très résistantes, sont détruites en peu de temps dans l'organisme du lapin, animal très sensible au charbon; nous pouvons admettre d'autant plus que des bactéries, aussi fragiles que les spirilles de la fièvre récurrente, surtout dans l'organisme du singe, qui ne succombe jamais à la maladie, peuvent être très vite détruites dans tous les organes, sauf dans ceux qui sont les plus faibles dans la lutte avec elles. A ce point de vue, nous ne trouvons des bactéries dans la rate que parce qu'elles ne peuvent pas y être si vite détruites que dans le foie et les autres organes.

Cette manière de voir est d'autant plus plausible que les tableaux microscopiques, qui ont été trouvés par M. Metchnikoff et M. Soudakewitch dans la rate des singes après la crise, sont à peu près les mêmes que ceux que j'ai trouvés dans la rate de mes lapins. Dans les deux cas, les bactéries se présentent entourées par des amas de leucocytes polynucléaires, dans l'intérieur desquels se produit principalement leur destruction. Comme il est bien prouvé que, dans le cas du charbon, ces tableaux doivent être envisagés comme le signe de la faiblesse des éléments cellulaires propres à la rate, éléments qui n'empêchent pas la multiplication des bactéries, il est bien probable que les mêmes

1. Nous avons vu, dans la description des phénomènes qu'on observe dans le foie immédiatement après l'injection, que les macrophages hépatiques, dont l'importance pour la destruction des bactéries est hors de doute, se composent probablement par fusion des cellules endothéliales avec les globules mononucléaires du sang. La rate, qui est capable d'envoyer dans le foie une grande quantité de ces globules, peut ainsi beaucoup favoriser l'action destructive de ce dernier organe.

tableaux ont aussi la même signification dans la fièvre récurrente.

Si nous envisageons à présent les autres faits qui nous sont encore connus au sujet de la rate, nous y trouverons des preuves nouvelles en faveur de notre manière de voir. Nous savons en effet que, dans les maladies infectieuses, partout où nous trouvons en général des bactéries dans les organes, c'est toujours principalement dans la rate; ce qui peut être considéré comme la preuve de la faiblesse de cet organe. L'organe qui est capable de détruire énergiquement les bactéries ne doit les contenir qu'en faible quantité : nous n'y pouvons trouver que les bactéries qui y ont été transportées depuis un temps très court, toutes les autres doivent être déjà complètement détruites. Enfin, la position anatomique de la rate plaide aussi contre sa faculté de débarrasser des bactéries le sang infecté. Étant un organe relativement petit, elle ne peut recevoir qu'une petite partie de la quantité totale du sang, de sorte que les bactéries auraient assez de temps pour infecter tous les organes avant qu'elles puissent être retenues par la rate.

Tout autrement se présentent les choses au sujet du foie. Grâce à son volume énorme, il peut retenir une grande quantité de sang, surtout si les vaisseaux des autres parties du corps sont contractés, de sorte que l'élimination de bactéries du sang infecté peut s'accomplir très vite. L'hyperhémie du foie est en effet le symptôme général de toutes les maladies infectieuses. Étant prouvé enfin que le foie détruit énergiquement des bactéries aussi résistantes que les bactéries charbonneuses, il est bien probable qu'il est capable de détruire aussi les autres espèces de bactéries. Nous avons donc le droit d'admettre, au moins provisoirement, que le foie est toujours l'organe central de la destruction des bactéries, et la rate un organe faible sur ce point.

c) *Chimiotaxie des leucocytes.* — Pendant les dernières années, il a été définitivement prouvé que les leucocytes se dirigent vers les bactéries, et les englobent grâce à leur sensibilité pour les produits chimiques, sécrétés par elles. En s'appuyant sur l'analogie avec la sensibilité des organismes unicellulaires qui se dirigent vers certaines substances et évitent les autres, on a admis que la chimiotaxie des leucocytes

est aussi soit positive soit négative. D'après cette opinion, la chimiotaxie négative des leucocytes devrait se manifester surtout envers les bactéries qui provoquent chez les animaux les maladies rapidement mortelles, avec apparition d'une grande quantité de bactéries libres dans le sang. On a toujours cité, comme l'exemple le plus frappant, le charbon chez les animaux sensibles, c'est-à-dire chez la souris, le cobaye et le lapin. On a nié pour ces animaux l'existence d'une phagocytose quelconque de la part des globules blancs qui, comme on le croyait, sont repoussés par les bactéries. Notre étude du développement du charbon chez le lapin nous a démontré que l'opinion citée ne peut point être appliquée à ce cas : il n'y a ici aucune répulsion des leucocytes par les bactéries, mais au contraire nous trouvons partout les signes les plus évidents d'une attraction énergique. En me fondant sur le fait que les globules blancs disparaissent du sang après des injections des bactéries les plus différentes, j'ai déjà avancé dans mon article précédent que les leucocytes ne renoncent jamais à englober les bactéries les plus toxiques, c'est-à-dire, qu'il n'existe chez eux qu'une chimiotaxie positive. Nos recherches actuelles ont rendu cette hypothèse encore plus probable. C'est pourquoi il ne me semble pas inutile de passer une courte revue des preuves que nous possédons jusqu'ici en faveur de l'existence d'une chimiotaxie négative chez les leucocytes.

M. Metchnikoff, dans ses *Leçons sur la pathologie comparée de l'inflammation*, cite surtout à ce sujet les expériences de M. Gabritchewsky et celles de MM. Massart et Bordet, imprimées dans ces *Annales* (t. IV et VI). Mais il me semble que la chimiotaxie négative n'est point prouvée par ces recherches.

En ce qui concerne les résultats obtenus par M. Gabritchewsky, ils nous démontrent seulement que l'attraction des leucocytes par des substances différentes est aussi différente : tandis que les unes les attirent très énergiquement, les autres restent presque sans aucune action. Mais l'absence d'une action attractive et la présence d'une action répulsive sont deux choses tout à fait différentes, et je ne peux admettre avec ce savant que les substances qui n'ont attiré dans ses expériences que très peu de leucocytes doivent être rangées parmi les substances douées d'une action répulsive.

Des preuves plus directes ont été données par MM. Massart et Bordet. Ces savants nous ont démontré que les cultures du bacille pyocyanique, dont l'action attractive sur les leucocytes est très énergique, ne les attirent plus quand elles sont mélangées avec des quantités suffisantes d'acide lactique. De ce fait, MM. Massart et Bordet concluent que l'acide lactique doit avoir une action répulsive très énergique, qui annihile ainsi l'action attractive des cultures. Cette conclusion serait bien fondée si nous avions affaire avec les attractions et répulsions d'un ordre purement physique, pareilles à celles qu'on observe entre le fer et l'aimant. Mais les choses se passent dans notre cas d'une manière tout à fait différente : l'attraction et la répulsion ne peuvent avoir lieu que par l'intervention de la sensibilité des leucocytes. L'addition aux cultures d'une substance qui entrave cette sensibilité, sans avoir une action répulsive quelconque, empêchera néanmoins les leucocytes de se diriger vers les cultures. Or l'acide lactique, en provoquant dans le milieu ambiant une réaction acide, doit nécessairement entraver la sensibilité des leucocytes qui ne peuvent vivre et fonctionner que dans les milieux alcalins. Ainsi je crois que l'exemple, choisi par MM. Massart et Bordet, ne prouve pas ce que ces auteurs ont voulu prouver.

Voilà toutes les preuves directes en faveur de la chimiotaxie négative des leucocytes. Il est évident qu'elles sont tout à fait insuffisantes. Il en est de même pour les preuves indirectes.

Parmi ces preuves indirectes, il faut mentionner le fait bien constaté qu'on ne trouve nulle part de phagocytose chez les animaux qui ont succombé à certaines maladies très aiguës. C'est le cas avec le charbon chez les animaux sensibles, avec le choléra des poules chez le lapin, etc. La marche du charbon chez les lapins nous a montré cependant que l'absence de phagocytose sur le cadavre, ou même pendant les derniers stades de la maladie, ne prouve nullement son absence pendant les premiers stades. Ainsi on peut bien supposer que la phagocytose existe aussi dans les autres maladies où on ne l'a pas encore trouvée jusqu'ici : pour la trouver, il faudrait suivre la méthode que j'ai suivie dans mon étude sur le charbon.

On a aussi cité souvent l'analogie entre la chimiotaxie des leucocytes et celle des organismes inférieurs : si ces derniers

présentent envers certaines substances la chimiotaxie négative, on croyait bien probable que cette chimiotaxie devrait exister aussi chez les leucocytes. Il me semble cependant que cette analogie ne prouve rien. Pour les organismes inférieurs, la présence de la chimiotaxie négative est très utile, parce qu'elle leur permet d'éviter plusieurs influences nuisibles. Pour les animaux supérieurs, sa présence chez les leucocytes serait fatale, parce qu'une seule bactérie suffirait alors pour amener inévitablement la mort de l'animal. C'est pourquoi je pense que la chimiotaxie négative des leucocytes, si elle a existé en effet, a dû être plus ou moins complètement éliminée par la sélection naturelle : les animaux dont les leucocytes sont doués de cette propriété ont moins de chances de survie.

Nous voyons donc que l'existence chez les leucocytes d'une chimiotaxie négative n'est pas prouvée jusqu'à présent d'une manière satisfaisante. Il faut ainsi laisser la question pour des expériences ultérieures. Si ces expériences sont défavorables à l'existence d'une chimiotaxie négative, nous pourrons alors attribuer à la théorie de la phagocytose une importance et une généralité beaucoup plus grandes qu'aujourd'hui. En effet, nous ne pourrons envisager la phagocytose comme un mode général de la lutte de l'organisme contre les bactéries, et l'opposer aux autres modes de défense (propriété bactéricide et antitoxique du sang), que lorsqu'il sera prouvé que la phagocytose est en réalité un phénomène tout à fait général. A ce sujet, j'ai été bien surpris de lire dans le *Centralblatt für Bacteriologie* une analyse de mon article précédent, écrite par M. Buchner, où ce savant, en insistant surtout sur les faits que j'ai cités en faveur de la faculté des leucocytes d'englober les bactéries les plus virulentes, en tire une conclusion tout à fait inattendue, à savoir que ces faits renversent complètement la théorie phagocytaire. Jusqu'ici tous les auteurs qui ont voulu combattre cette théorie tantôt niaient la présence des phénomènes de phagocytose, tantôt leur assignaient la place la plus restreinte possible. Buchner est le premier qui reproche à cette théorie la généralité des phénomènes sur lesquels elle est fondée. Je crois que c'est là le signe que l'opposition contre la théorie phagocytaire s'affaiblit même en Allemagne et que, dans peu de temps, cette théorie sera généralement acceptée.

Les lecteurs de ces *Annales* qui connaissent les mémoires de M. Metchnikoff sur l'immunité peuvent me demander comment on peut concilier la théorie phagocytaire de l'immunité avec l'absence de la chimiotaxie négative des leucocytes. Je démontrerai, dans un article prochain, que la chimiotaxie négative n'est point nécessaire pour la théorie de l'immunité, et que quelques modifications peu essentielles dans la théorie de M. Metchnikoff sont tout à fait suffisantes pour la mettre complètement d'accord avec les faits réels.

Toutes les préparations sur lesquelles est fondée mon étude du charbon ont été faites à l'Institut Pasteur dans le laboratoire de M. Metchnikoff. Je me sens obligé d'exprimer ici ma sincère reconnaissance à ce savant pour l'intérêt si vif qu'il a pris à mon travail. L'étude détaillée des préparations a été faite principalement à l'Institut de médecine expérimentale de Saint-Pétersbourg, dans le laboratoire de M. Nencki, auquel j'exprime aussi toute ma gratitude pour avoir mis à ma disposition les riches moyens d'étude que présente son installation.

APPENDICES

I

QUANTITÉ TOTALE DE BACTÉRIES DANS LE FOIE ET DANS LA RATE

	Numéros des stades	Temps après l'injection	Quantité de bactéries dans le foie	Sur 10 champs de vision dans la rate
1re PÉRIODE	—	2 1/2 m.	11,2	4,2
	—	5 m.	19,1	8,1
	—	7 1/2 m.	42,8	10,2
	—	10 m.	21,2	12,6
	—	15 m.	19,5	16,7
	—	20 m.	19	12,8
	—	40 m.	15,9	»
	1	1 h.	12,8	16
	2	2 h.	8,4	9,6
	3	3 h.	4,9	6,5
	4	4 h.	3,9	5,9
2e PÉRIODE	5	6 h.	4,4	9,8
	6	8 h.	3,9	9,2
	7	10 h.	2,6	4,9
	8	12 h.	3,8	5,4
	9	11 h.	0,8	0,7
	10	13 h.	2,2	1,8
	11	14 h.	1,7	2,7
	12	17 h.	2,1	10,2
	13	18 h.	1,1	2,9
	14	19 h.	1,4	2,7
3e PÉRIODE	15	26 1/2 h.	1,4	4,8
	16	15 h.	2,5	8,8
	17 a	25 1/2 h.	4	23,5
	17 b	9 h.	8,9	15,1
	18 a	20 h.	2,5	74
	18 b	7 h.	27,3	57,6
	19	21 h.	53,8	353
	20	27 1/2 h.	100	innombrables.
	21	16 h.	120	id
	22 (agonie)	19 1/2 h.	presque innombrables.	id
	23 (mort)	28 1/2 h.	innombrables.	id

II

BACTÉRIES DANS LE FOIE

Période	Numéros des stades	Temps depuis l'injection	Pour cent de bactéries dans les leucocytes	dans les macrophages hépat.	à l'état libre
1re PÉRIODE	—	2 1/2 m.	13,8	86,2	—
	—	7 1/2 m.	23,4	76,6	—
	—	10 m.	17	83	—
	—	15 m.	14	86	—
	—	20 m.	15	85	—
	—	40 m.	18,5	81,5	—
	1	1 h.	21	79	—
	2	2 h.	25	75	—
	3	3 h.	36	64	—
	4	4 h.	40	60	—
2e PÉRIODE	5	6 h.	37	63	—
	6	8 h.	27	73	—
	7	10 h.	48	52	—
	8	12 h	33	67	—
	9	11 h.	38	62	—
	10	13 h.	41	59	—
	11	14 h.	35	65	—
	12	17 h.	52	48	—
	13	18 h.	42	58	—
	14	19 h.	54	46	—
	15	26 1/2 h.	14	86	—
3e PÉRIODE	16	15 h.	13	82	5
	17 a	25 1/2 h.	14	79	7
	17 b	9 h.	20	80	—
	18 a	20 h.	10	84	6
	18 b	7 h.	17	73	10
	19	21 h.	3	85	12
	20	27 1/2 h.	7,5	72,5	20
	21	16 h.	0,6	30.4	69

22 et 23. Presque toutes les bactéries sont à l'état libre.

III

ÉTAT DES BACTÉRIES DANS LE FOIE

Période	Numéros des stades	Bactéries normales			Bactéries en voie de dégénérescence		Bactéries dégénérées	
		d. les leucoc.	d. les macroph.	à l'état libre	d. les leucoc.	d. les macroph.	d. les leucoc.	d. les macroph.
1re PÉRIODE	1	8	12	—	7	30	6	37
	2	6	7	—	11,5	32,5	7,5	35,5
	3	7	12	—	18	26	11	26
	4	7	6	—	15	21	18	33
2e PÉRIODE	5	7	8	—	22	33	8	22
	6	1	6	—	15	22	11	45
	7	10	4	—	21	16	17	32
	8	3,5	6	—	8,5	10,5	21,5	50,5
	9	1	1	—	5	11	32	50
	10	6	4	—	21	13	14	42
	11	2	4	—	11	1	22	60
	12	6	2	—	20	9	26	37
	13	2	2	—	14	12	26	44
	14	10	2	—	28	16	16	28
	15	7	23	—	3	33	4	30
3e PÉRIODE	16	1	25	5	5	16	7	41
	17 a	2	48	7	2	15	10	16
	17 b	3	16	—	5	12	12	52
	18 a	1	35	6	3	18	6	31
	18 b	6	50	10	3	10	8	13
	19	2	71	12	1	4	0	10
	20	6,5	67	15,5	1	4,5	0	5,5
	21	0,6	30,4	69	0	0	0	0
	22, 23	Presque toutes les bactéries sont normales et se trouvent à l'état libre.						

IV

BACTÉRIES DANS LA RATE

Période	Numéros des stades		Temps depuis l'injection	Pourcentage des bactéries dans les leucocytes	Pourcentage des bactéries dans la pulpe de la rate
1re PÉRIODE	—		2 1/2 m.	11	89
	—		5 m.	28	72
	—		7 1/2 m.	32	68
	—		10 m.	46	54
	—		15 m.	50	50
	—		20 m.	55	45
	1		1 h.	42	58
	2		2 h.	38	62
	3		3 h.	57	43
	4		4 h.	57	43
2e PÉRIODE	5		6 h.	50	50
	6		8 h.	43	57
	7		10 h.	67	33
	8		12 h.	41	59
	9		11 h.	67	33
	10		13 h.	69	31
	11		14 h.	28	72
	12		17 h.	69	31
	13		18 h.	42	58
	14		19 h.	75	25
	15		26 1/2 h.	15	85
3e PÉRIODE	16		15 h.	39	61
	17	a	25 1/2 h.	3	97
		b	9 h.	30	70
	18	a	20 h.	9	91
		b	7 h.	8,5	91,5
	19, 20, 21, 22, 23		Presque toutes les bactéries se trouvent dans la pulpe et sont dans la plupart des cas complètement libres.		

V

ÉTAT DES BACTÉRIES DANS LA RATE

Période	Numéros des stades		Bactéries normales		Bactéries en voie de dégénérescence		Bactéries dégénérées	
			dans la pulpe	dans les leucocytes	dans la pulpe	dans les leucocytes	dans la pulpe	dans les leucocytes
1re PÉRIODE	1		12	11	15,5	12,5	30,5	18,5
	2		13	6	20	10	29	22
	3		16	25	16	22	11	10
	4		10,5	7	20	33,5	12,5	16,5
	5		16	8	22	17	12	23
2e PÉRIODE	6		28,5	9	13	17	15,5	17
	7		11	19	8	22	14	26
	8		36	11	11	7	12	23
	9		3	5	10	20	20	42
	10		10	12	13	27	8	30
	11		56	5	10	8	6	15
	12		7	15	4	21	19	34
	13		24	8	18	4	16	30
	14		6	11	12	30	7	34
	15		61	6	15	3	9	6
3e PÉRIODE	16		41	6,5	6,5	5	13	28
	17	a	84	1,5	10	0,5	3	1
		b	63	25,5	6	2	3,5	3
	18	a	82	6	7	3	2	0
		b	82	3,5	3	1	4	3,5
	19, 20, 21, 22, 23		Presque toutes les bactéries sont normales et se trouvent dans la pulpe à l'état libre.					

UNE ÉPIZOOTIE ET UNE ÉPIDÉMIE AIGUËS DE RAGE

à MADÈRE.

PAR LE Dr GOLDSCHMIDT.

L'éclosion successive d'une épizootie et d'une épidémie de rage dans un pays où cette maladie a toujours été inconnue, est chose si rare, peut-être même si unique, que je voudrais donner ici l'histoire de ce qui s'est passé récemment à Madère. Cette possession portugaise, découverte au commencement du xve siècle, était restée indemne de rage. Aucune publication, et elles sont nombreuses, ne signale de cas de cette maladie, ni à Funchal, capitale de l'île, ni dans les environs; et comme l'île n'a que huit cents kilomètres carrés et que la population est très dense, aucun cas de rage n'a de chances de rester ignoré des autorités compétentes, auxquelles la maladie est bien connue, du fait qu'elle est endémique sur le continent portugais.

Le nombre des chiens a toujours été très grand à Madère, mais difficile à indiquer, faute d'un recensement. On reste au-dessous du vrai chiffre en admettant, pour la population campagnarde et citadine, un chien par deux *feux* de six personnes. Pour une population de 130,000 habitants, cela ferait 11,000 chiens[1]. En dehors de la capitale, qui contient 25,000 habitants, il n'y a que des villages, clairsemés et peu populeux. La population rurale, très dense, est éparpillée sur tout le territoire cultivable ; chacun se bâtit une chaumière sur son petit lopin de terre, qui suffit rarement à l'entretien d'une nombreuse famille. Malgré sa pauvreté et la sécurité proverbiale de l'île, le paysan reste méfiant, vit dans la crainte des voleurs et se protège par ses chiens. Vers la côte, où l'eau d'irrigation ne manque pas, ces propriétés lilliputiennes se touchent. En montant vers les régions arides, elles s'espacent et sont séparées par des ravins profonds. J'insiste sur ces détails topographiques pour les mettre

1. Le nombre des chiens de l'Europe centrale est très élevé : on comptait en 1846 en France trois millions et demi de chiens. Il y a en ce moment en Europe un chien pour environ 16 habitants.

en regard du caractère explosif de l'épizootie, qui a apparu presque simultanément à Funchal et dans les paroisses les moins accessibles de l'île.

Les chiens se nourrissent comme ils peuvent, ordinairement d'une façon misérable. La race est loin d'être pure : c'est presque toujours le type du chien errant, produit d'un croisement de hasard, rarement un peu anobli par l'introduction d'un meilleur sang. Malgré ces conditions d'abandon, la rage était inconnue à Madère comme elle l'est encore aux Canaries et dans l'Afrique tropicale. Aux premiers jours du mois de juin 1892, on entendit tout à coup parler d'une « nouvelle » maladie des chiens, qui les emportait en quelques jours avec des symptômes qu'on ne pouvait rapporter qu'à la rage. Mais la sécurité de ce côté semblait si assurée, et d'un autre côté l'acuité de la maladie était telle, qu'on écarta tout d'abord ce soupçon, dont la réalité ne fut démontrée que plus tard, à la suite d'inoculations réussies.

Après une période d'excitation, la paralysie apparaissait au bout de trois à quatre jours chez les chiens, qui devenaient mordeurs, même pour leurs maîtres. Le nombre des personnes mordues devint bientôt très grand : mais on ne croyait pas à la rage, et personne ne s'occupait de ces morsures.

Dès la fin du mois de juin, et surtout dans la première quinzaine de juillet, des rapports venus de tous les coins de l'île signalaient l'éclosion de la même maladie chez les chiens, les chèvres et les chats.

Chez les chiens, l'incubation durait en moyenne vingt-cinq à trente jours et la maladie quatre à cinq jours. Pendant la période aiguë de l'épidémie (trois mois), on releva trois cents cas de mort chez les chiens de la partie méridionale, composant environ la moitié de l'île, et plus de 1,000 chiens suspects furent abattus au dépôt municipal.

On n'a constaté qu'un seul cas de guérison d'une rage déclarée, et je m'empresse de le rapporter d'après des informations que je dois à senhor Tierno, vétérinaire du district de Funchal, auquel j'adresse tous mes remerciements pour l'assistance utile qu'il a bien voulu me prêter dans ces recherches.

Chienne de trois ans, inféconde, est devenue triste et a cessé de manger le 15 août 1892 ; paralysie, le 16, de la mâchoire inférieure. Beaucoup de bave et, depuis le 17, hurlement rauque continu. Après cinq jours, para-

lysie complète, sauf pour la queue, que la bête agite quand elle voit son maître. Dysphagie considérable : c'est avec de grands efforts qu'elle avale le bouillon que son maître, muni de gants de gros cuir, lui verse dans la bouche. La paralysie de la mâchoire dure un mois, pendant lequel la bête continue à être nourrie de bouillon de poulet et de viande hachée. La diminution des symptômes paralytiques est accompagnée du retour à l'état normal de la langue, jusque-là noire et enflée. La paralysie générale n'a disparu qu'au bout de quatre mois; mais, après six mois, il y avait encore une légère gêne dans le mouvement du cou et de l'épaule droite.

Aucun cas nouveau n'a été signalé depuis les premiers jours de décembre 1892, et la durée de l'épizootie peut ainsi être fixée à six mois, dont les deux derniers n'ont compté que très peu de cas.

Les autres animaux ont été peu atteints. Je n'ai pu recueillir, à Funchal et dans les environs, que six cas parmi les chats, quatre parmi les porcs et six parmi les chèvres et boucs. Dans l'espèce bovine, il n'y a eu que deux cas, contestables.

Malheureusement, la population de l'île a été fortement éprouvée. Il y a eu 9 morts sur les 60,000 habitants des paroisses méridionales (Funchal, Santa-Cruz et Màchico) ; sur la population de la France, cela ferait 4,500 morts. Le dernier cas mortel fut signalé en novembre 1892. Les journaux ont pourtant cité un nouveau cas de mort survenue le 14 septembre 1893 sur un enfant de neuf ans, mordu neuf mois auparavant.

Cette épizootie n'est certainement pas née sur place, et doit avoir été importée par quelque chien venu du continent et débarqué à l'insu de la douane, pourtant très sévère. Celle-ci n'a relevé que l'entrée d'un chien arrivé de Lisbonne, le 8 mai 1892, et mort rabique le 23 juillet 1892, après une maladie de 9 jours, un peu plus longue par conséquent que la moyenne pour les chiens indigènes (4 à 5 jours). Mais la maladie, ayant éclaté au commencement de juin, doit avoir une autre origine : un chien errant a sans doute parcouru l'île, mordant les chiens du pays, chez lesquels la maladie a évolué plus vite que chez leurs congénères du continent. C'est un nouvel exemple de l'augmentation d'intensité que subit une maladie épidémique, quand elle arrive dans un pays neuf, et on peut le rapprocher des exemples classiques de l'apparition de la rougeole aux îles de Far-Oer et du choléra en Europe.

A Madère, la rage, après sa rapide explosion, s'est éteinte en

peu de temps, grâce aux mesures prises, et on n'en a signalé aucun nouveau cas chez les chiens depuis les premiers jours de décembre 1892 jusqu'à la fin de 1893. J'ai attendu pour faire cette publication, précisément pour pouvoir démontrer la possibilité de se débarrasser d'un seul coup d'une aussi terrible maladie par l'extermination impitoyable de tous les chiens malades ou suspects. La police a rigoureusement imposé l'emploi de la muselière et abattu tous les chiens qui n'en avaient pas. Après plus d'une année d'interruption, il n'y a plus guère à redouter des réapparitions de l'ancienne épidémie, à la suite d'une longue incubation, et l'île va retrouver son ancienne sécurité.

Reste le danger d'une longue incubation chez l'homme. La gravité de l'épidémie chez les habitants a marché parallèlement à celle de l'épizootie. Les premières victimes ont été deux enfants, morts à deux jours de distance, à la fin d'août, après une incubation de trente-huit à quarante jours, et une durée de maladie de trois à quatre jours. La moyenne des durées d'incubation a été entre quarante et soixante jours. On en a signalé une de neuf mois, mais je ne peux pas en garantir l'authenticité. Peut-être y a-t-il encore, en incubation, des cas retardataires; mais cela est bien peu probable, étant donné que le dernier cas avéré d'hydrophobie humaine date de plus de huit mois.

Le traitement des malades n'a donné aucun résultat. L'un d'entre eux est venu se faire soigner à l'Institut Pasteur et se porte bien depuis un an.

Les autopsies faites par M. Tierno, et publiées dans l'*Agricultura portuguese*, Lisboa, t. IV, nº 92, témoignent qu'au moment où l'épidémie avait son caractère le plus aigu, on relevait des symptômes de gastro-entérite, de péritonite et d'inflammation générale des organes abdominaux. L'inoculation de la moelle aux cobayes et lapins a toujours donné des résultats positifs.

En résumé, nous voyons par ces faits: 1° que la rage n'est pas spontanée ; 2° qu'elle revêt une très grande acuité, quand elle arrive dans un pays indemne; 3° qu'on peut l'en faire disparaître en exterminant tous les chiens malades ou suspects ; 4° que la rage du chien guérit parfois spontanément; 5° que l'incubation et la durée de la rage dans les épidémies aiguës sont moins longues que dans les cas endémiques.

REVUES ET ANALYSES

RÉPONSE A QUELQUES CRITIQUES DE LA THÉORIE DES PHAGOCYTES

REVUE CRITIQUE

Il n'est plus besoin, comme il y a quelques années, de reprendre la théorie des phagocytes dans son ensemble, pour en soutenir les principes. On peut considérer comme généralement admis que l'organisme de l'homme et de la grande majorité des animaux possède un moyen de défense contre les microbes pathogènes dans l'ensemble de ses éléments phagocytaires. Il est aussi généralement admis que les phagocytes sont en état d'englober les microbes vivants et virulents, et de les tuer et digérer dans leur intérieur. Je n'ai pas besoin de citer ici les témoignages nombreux, accumulés pendant ces dernières années; je me bornerai seulement à rappeler que les trois séances que la Société pathologique de Londres a consacrées, au printemps de 1892, à la discussion des questions d'immunité et de phagocytose, ont abouti à un résultat qu'une note du *Deutsche medicinische Wochenschrift* (1892, p. 296) résume en ces termes : « La majorité des auteurs s'est prononcée en principe pour la théorie de la phagocytose. »

Mais bien que cette théorie soit acceptée en général, il reste encore un certain nombre de points sur lesquels on n'est pas d'accord. De temps en temps il surgit quelque objection d'ordre plus ou moins particulier, et il s'accumule ainsi toute une série de données sur lesquelles il est utile de s'expliquer.

Nous donnons dans cette Revue la première place à un travail de M. Kurth Müller sur le charbon des rats, travail exécuté avec un soin tout particulier sous la direction de M. Eberth, à Halle.

On se rappelle sans doute que le charbon des rats a été pour ainsi dire la pierre de touche des théories de l'immunité. C'est lui qui a été le point de départ des théories humorales de M. Behring, et qui a fourni à M. Franck des armes contre la théorie des phagocytes.

Cette question du charbon des rats a été débattue dans une série d'articles (dont deux ont paru dans ces *Annales*, t. IV et V). M. Kurth

Müller lui a consacré toute une monographie, publiée d'abord dans une série d'articles des *Fortschritte der Medicin*, 1893, nos 8, 9, 11, 12, 13, 14 et 15. Faites sur plus de 300 rats, dont la généalogie a été soigneusement établie, les recherches de M. Müller ont porté en grande partie sur les phénomènes intimes qui se passent dans les tissus de ces animaux, soumis à l'infection charbonneuse.

M. K. Müller a constaté, comme beaucoup de ses prédécesseurs, que les rats, quoique moins sensibles au charbon que les autres rongeurs de laboratoire, sont cependant loin d'être réfractaires vis-à-vis de la bactéridie. Sur 221 rats, inoculés une ou plusieurs fois (jusqu'à six) avec le bacille charbonneux, 6 seulement ont résisté à toutes les épreuves. La nourriture animale, ainsi que le traitement avec l'extrait de viande de Liebig, ont augmenté la résistance de ces animaux vis-à-vis de la bactéridie.

Mais lorsque M. K. Müller a voulu pénétrer dans le mécanisme de cette résistance de l'organisme des rats, et s'est demandé si les phagocytes y jouaient un rôle quelconque, il est arrivé à un résultat absolument négatif. Pour M. Müller, les leucocytes qui s'accumulent en grand nombre autour des points envahis par la bactéridie ne contribuent pas plus à la résistance des rats qu'un grand nombre d'autres éléments des tissus, et toujours à titre de cellules sécrétant des substances qui détruisent les bacilles. Cette déduction est basée sur cette observation de M. Müller que, malgré l'abondance des leucocytes dans les foyers infectieux, les bactéridies dégénèrent en dehors des cellules et ne sont jamais englobées dans l'intérieur de celles-ci. Ce résultat a été d'abord acquis avec les organes des rats morts du charbon. Les bactéridies ont été trouvées dans des vacuoles du tissu hépatique, mais jamais dans l'intérieur des cellules.

M. K. Müller dit que, dans cette question de la résistance, son attention s'était surtout portée vers l'étude des organes des rats morts du charbon, et il avoue qu'après avoir obtenu avec eux des résultats négatifs, c'est avec un parti pris (*etwas voreingenommen*) qu'il s'est mis à examiner le processus local chez les rats réfractaires. L'observation a vite confirmé son scepticisme et les bactéridies dégénérées ont été toutes trouvées en dehors des cellules. M. K. Müller reconnaît lui-même que cette partie de son travail n'est pas aussi complète qu'il l'aurait voulu.

Je n'ai pas besoin d'insister ici sur le côté logique de la question, et d'argumenter contre la prémisse de M. K. Müller que les rats morts charbonneux devaient absolument présenter des phénomènes de phagocytose. Cette discussion devient inutile du moment que dans ces conditions *la phagocytose est tout ce qu'il y a de plus manifeste*. Seule-

ment, comme je l'ai longuement développé dans mon mémoire sur le charbon des rats (ces *Annales*, 1890, p. 193) ce sont surtout les macrophages et non les leucocytes polynucléaires (microphages) qui luttent contre la bactéridie dans le foie et la rate, viscères étudiés surtout par M. K. Müller. Il n'y a pour moi aucun doute que les vacuoles renfermant des bactéridies, décrites par mon adversaire, ne soient autre chose que ces grandes vacuoles si nombreuses dans l'intérieur des macrophages du foie et de la rate des rats morts du charbon.

M. K. Müller a été victime de l'erreur dans laquelle sont tombés déjà plusieurs observateurs. Étudiant la phagocytose, il a cherché les leucocytes chargés de bactéridies, et il a laissé passer inaperçus les macrophages, bien autrement remarquables que les leucocytes polynucléaires. Déjà, à la lecture de la partie historique du mémoire de M. K. Müller, on est surpris que ce savant ne mentionne point mes recherches sur la réaction macrophagique des rats; mais cette surprise devient plus grande encore lorsque, dans l'exposé de ses recherches microscopiques, on ne trouve rien se rapportant aux macrophages du foie et de la rate. Quoique j'aie tâché, dans le mémoire cité, de décrire et de représenter ces phagocytes de la façon la plus complète, je dois dire qu'en réalité on trouve des formes encore plus compliquées que celles que j'avais dessinées. Souvent on observe dans le foie de grands amas de bactéridies normales et dégénérées, à côté de leucocytes polynucléaires se colorant plus ou moins bien. On trouve ainsi le tableau, décrit par M. K. Müller, de bacilles morts entre les leucocytes réunis en amas; mais un examen plus approfondi nous apprend aussitôt que ni les bacilles, ni les leucocytes ne sont libres, et que les uns comme les autres se trouvent dans l'intérieur de macrophages souvent colossaux, avec leur noyau si caractéristique.

Non seulement j'ai étudié cette phagocytose macrophagique à maintes reprises, mais j'ai pu la montrer à un grand nombre d'autres observateurs. Des préparations du foie de rats charbonneux servent au cours de microbie à l'Institut Pasteur comme démonstration de la réaction des macrophages. Pendant mon séjour à Zurich, dans l'été de 1890, j'ai eu l'occasion de montrer quelques-unes de ces préparations à MM. Klebs, Hanau et Lubarsch, qui n'ont pas hésité à reconnaître que les bactéridies étaient bien dans l'intérieur des macrophages.

Si M. K. Müller n'a pu constater la phagocytose des leucocytes polynucléaires au point d'introduction du virus chez des rats résisants, cela tient sûrement aux circonstances déjà mentionnées plus haut. M. K. Müller a de plus eu tort de ne pas avoir répété mes expériences sur l'inoculation des bactéridies dans la chambre antérieure de l'œil des rats, car dans ces conditions, la phagocytose microphagique

s'observe avec la plus grande facilité. J'ai eu souvent occasion de montrer cet exemple d'activité phagocytaire aux élèves du cours de l'Institut Pasteur. M. de Christmas qui, comme on sait, a été le premier à nier le rôle des phagocytes dans le charbon des rats, a pu également se convaincre de la réalité du phénomène sur mes préparations de l'exsudat de l'œil. M. Franck, qui soutenait autrefois[1] que, chez les rats inoculés avec le charbon, la phagocytose faisait complètement défaut, a pu également observer ce phénomène sur une de mes préparations que je lui avais envoyée. Voici comment il s'exprime dans sa lettre : « La préparation envoyée (il s'agit d'une préparation de l'exsudat de l'œil d'un rat résistant au charbon) montre avec évidence les bacilles intracellulaires. »

Je dois rappeler encore que plusieurs autres observateurs, comme MM. Hess et Sawtschenko, ont également constaté la phagocytose chez des rats inoculés avec le bacille charbonneux[2]. On peut donc considérer cette question comme *définitivement résolue* dans un sens tout à fait opposé à celui de M. K. Müller. Le charbon des rats, au lieu de présenter une exception, peut servir comme exemple de phagocytose.

M. Hankin a énoncé une thèse (*Centralb. f. Bakter.*, 1892, XII, nos 22, 23) d'après laquelle « les cellules de l'organisme luttent non seulement en dévorant les microbes, mais encore par l'intermédiaire d'autres cellules, caractérisées par la présence de granulations éosinophiles et sécrétant des substances bactéricides ».

1. *Centralb. f. Bakteriologie*, 188.

2. Je n'ai pas besoin de m'arrêter sur les résultats négatifs de certains observateurs, comme MM. Frank et Lievin, parce que leurs données sont infirmées par les résultats positifs cités plus haut. M. Lievin, un de mes adversaires en Russie, a cru tout récemment (v. *Vratch*, 1893, pp. 1105 et 1146) pouvoir nier le rôle des phagocytes dans le charbon de l'homme, et cela bien que, dans neuf cas étudiés par lui, il ait trouvé des phagocytes renfermant des bactéridies. Si M. Lievin interprète ses observations dans un sens défavorable à la théorie des phagocytes, cela tient en partie à ce qu'il ignore un des principaux travaux sur le sujet, celui de M. Lubarsch (*Zeitschr. für klin. Med.*, t. XIX, 1891). Cet auteur considère comme hors de doute que la destruction des bactéridies dans le charbon humain est parallèle à la phagocytose.

M. Lievin, si résistant à admettre la phagocytose malgré ses propres constatations, accepte sans le moindre scrupule (p. 1148) la propriété bactéricide du sérum sanguin de l'homme vis-à-vis du bacille charbonneux, et cela sans l'appui d'une seule expérience, et en dépit des résultats négatifs de M. Stern (*Zeitschr. f. klin. Med.*, t. XVIII), dont il ignore le travail, comme celui de M. Lubarsch.

M. Lievin va même si loin que, pour expliquer la présence des bactéridies dans les phagocytes endothéliaux du foie, il suppose, vu l'immobilité de ces cellules, que les bacilles pénètrent d'eux-mêmes dans leur intérieur. Or, il est connu depuis longtemps que ces cellules englobent des corps inertes (poudres de carmin bactéries tuées, etc.) par l'intermédiaire de leurs appendices mobiles.

Dans une Revue publiée en janvier 1893 (ces *Annales*, t. VII), j'ai tâché de démontrer que cette tentative pour diminuer le rôle des phagocytes n'était point justifiée.

M. Hankin vient de répondre à mes objections (*Centralb. f. Bakter.*, t. XIV, nº 25, 23 déc. 1893). Il persiste à affirmer que les granulations se colorant par l'éosine fournissent la substance bactéricide des humeurs, sans cependant appuyer cette conclusion par des arguments nouveaux.

Contre mon objection principale que l'humeur aqueuse (qui ne renferme guère de cellules à granulations éosinophiles) exerce une action bactéricide aussi manifeste que le sang, M. Hankin invoque deux arguments : 1º l'humeur aqueuse est un produit de sécrétion cellulaire; 2º ce liquide n'est bactéricide que pour le bacille typhique. Mais l'humeur aqueuse, quoique de sécrétion cellulaire, ne peut être nullement attribuée à l'action des cellules à granulations éosinophiles. M. Hankin n'essaie même pas de formuler une affirmation semblable, et cependant c'est le point essentiel de la question. D'un autre côté, il est inexact que l'humeur aqueuse ne soit pas bactéricide pour d'autres bactéries que le bacille typhique. Dès les premières recherches sur la propriété bactéricide des liquides de l'organisme, il a été constaté que l'humeur aqueuse détruit les bacilles charbonneux. Ce fait a été confirmé par M. Buchner et par moi-même dans un travail publié dans le *Journal of pathology*, 1892, nº 1, p. 13. M. Hankin paraît ignorer cet article, dans lequel j'ai réuni les données sur la propriété bactéricide de l'humeur aqueuse, et dans lequel j'ai mentionné aussi l'inexactitude des affirmations de M. Gamaleïa sur l'humeur aqueuse des moutons vaccinés contre le charbon, affirmations que M. Hankin accepte.

Lorsque M. Hankin invoque le fait que certains microbes donnent des cultures dans l'humeur aqueuse des animaux réfractaires, cela n'infirme pas du tout ma critique. On sait bien que le sang et le sérum sanguin finissent, comme l'humeur aqueuse, par donner des cultures, mais cela après une période de manifestation du pouvoir bactéricide.

Ma première objection contre M. Hankin, à savoir que la propriété bactéricide s'observe dans un milieu privé de granulations éosinophiles, persiste donc dans son intégrité.

Ma seconde objection contre la théorie de M. Hankin est basée sur le fait que les bactéries sont englobées par les phagocytes vivants et non tués par une action préalable des « alexines ». Ce fait a été constaté si souvent qu'il est inutile d'insister davantage sur lui. Des bactéries englobées par des phagocytes résistants sont tuées et digérées par ces cellules. Mais si les phagocytes remplis de microbes meurent, les bactéries se développent dans l'intérieur de ces cellules

et pullulent dans le liquide de l'exsudat, non gênées par les « alexines ». Ce fait, qui démontre l'action bactéricide des phagocytes, rejette en même temps toute théorie sur le pouvoir microbicide des liquides dans l'organisme.

Ma troisième objection consiste dans la constatation du fait que les phénomènes de phagocytose et de digestion intra-cellulaire des microbes s'observent chez les invertébrés, qui n'ont pas de grains éosinophiles dans leurs cellules. Je puis étendre ce résultat même à certains vertébrés inférieurs, qui n'ont pas de grains éosinophiles, et dont les phagocytes détruisent une quantité de microbes.

Mais, en dehors de toutes ces objections, je dois insister sur ce que M. Hankin n'a jamais fourni de preuve du caractère sécrétoire des cellules à grains éosinophiles. Il considère ces grains comme des produits de sécrétion, sans jamais avoir appliqué les méthodes ingénieuses de M. Heidenhain et d'autres physiologistes, ni fourni de données précises sur l'origine des granulations éosinophiles. Mes propres observations m'ont montré que ces grains peuvent se développer au dépens des particules ingérées par des phagocytes et, entre autres, au dépens des microbes. Ainsi j'ai vu, dans des cas de phagocytose très prononcée chez des cobayes inoculés avec le vibrion cholérique, que ces bactéries, sans perdre leur forme spirale, se transforment en corps fixant l'éosine. Le fait que les granulations vitellines et les plaques d'aleurone se colorent également par cette couleur, renforcent la supposition que les grains éosinophiles représentent un dépôt nutritif accumulé dans les phagocytes.

A la fin de sa réplique, M. Hankin invoque en faveur de sa théorie le mémoire de MM. Kanthack et Hardy sur la destruction des bacilles charbonneux par les leucocytes de la grenouille. Comme ce mémoire n'a paru jusqu'à présent que sous forme de notice préliminaire (*Proceedings of the R. Soc. London*, 1892, p. 267), il est impossible d'en faire la critique détaillée. Mais puisque M. Hankin lui attribue une grande importance dans la question qui nous occupe, je suis obligé de lui donner quelques explications.

Les recherches de MM. Kanthack et Hardy, réunies dans leur note, se rapportent, — pour ce qui concerne notre sujet, — uniquement à l'observation des phénomènes dans des gouttes suspendues de lymphe des grenouilles, à laquelle on a ajouté quelques bactéridies. Ces auteurs ont vu que les cellules éosinophiles étaient les premières à s'approcher des bacilles, et que les vrais phagocytes n'intervenaient que plus tard. Pendant une seconde période, les deux espèces de leucocytes se fusionnent et constituent des vrais plasmodes, détruisant les bactéridies. Les grains éosinophiles four-

niraient ainsi les substances bactéricides primaires; les phagocytes dans ces conditions n'auraient qu'à digérer les microbes déjà rendus complètement inoffensifs.

La phagocytose des grenouilles, infectées avec la bactéridie, a déjà été souvent l'objet de recherches scientifiques. Dans son premier travail de bactériologie, resté si célèbre, M. Koch a décrit des bacilles charbonneux dans l'intérieur des cellules. Plus tard cette phagocytose a été observée et photographiée dans l'Atlas de MM. C. Fränkel et R. Pfeiffer (pl. XXI). Eh bien, ces auteurs ont-ils jamais vu, dessiné ou photographié des plasmodes, provenant d'un fusionnement des cellules éosinophiles avec des phagocytes? Il est évident que ces plasmodes de MM. Kanthack et Hardy sont uniquement des produits artificiels, développés dans les conditions particulières (observation dans des gouttes suspendues), dans lesquelles se sont placés ces auteurs. Moi-même je me suis occupé à plusieurs reprises des phénomènes de la phagocytose des grenouilles, et je puis affirmer que les phénomènes se passent tout autrement que dans les gouttes de mes contradicteurs. On voit bien que ce sont des phagocytes isolés qui s'incorporent des bactéridies parfaitement intactes, et dont la vitalité peut être démontrée comme je l'ai déjà fait dans mon mémoire publié en 1888, dans les *Archives de M. Virchow*.

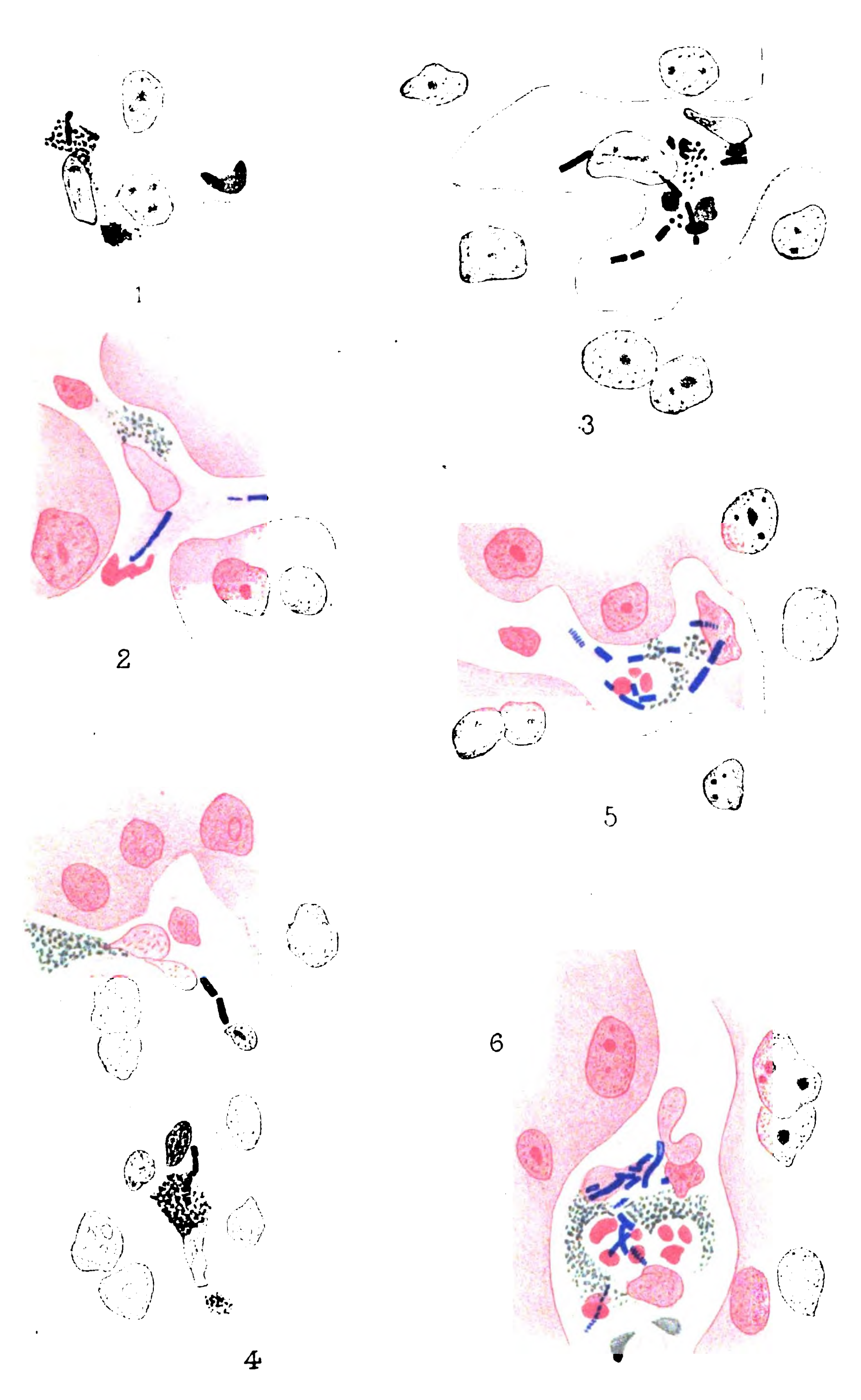
Si on étudie la phagocytose chez les grenouilles en hiver, époque où les leucocytes éosinophiles sont fréquentes dans la lymphe, on éprouvera quelquefois une certaine difficulté pour éliminer le rôle de ces cellules. Mais alors on n'a qu'à inoculer les bacilles charbonneux dans la chambre antérieure de l'œil des grenouilles. Dans l'exsudat qui se produit, il ne pénètre qu'un petit nombre de leucocytes éosinophiles, et cependant la phagocytose, exercée par des vrais phagocytes, est des plus marquées. En même temps on pourra facilement constater la vitalité des bactéridies dans cet exsudat.

Il n'est donc nullement possible de tirer des observations de MM. Kantack et Hardy une preuve quelconque en faveur de la théorie des alexocytes de M. Hankin, qui se trouve en plein désaccord avec un grand nombre de faits bien établis.

El. Metchnikoff.

Le Gérant : G. Masson.

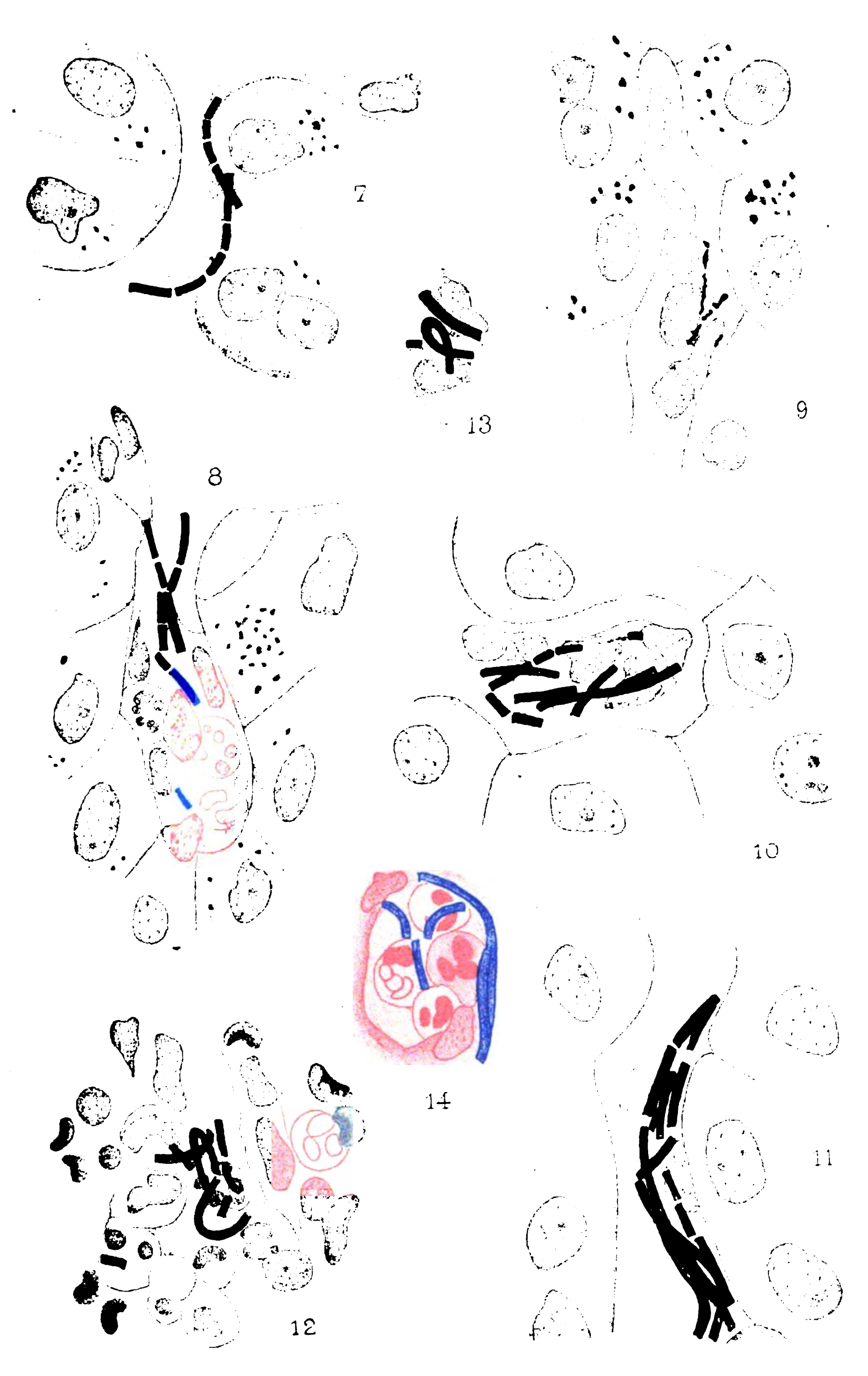
Sceaux. — Imprimerie Charaire et Cie.



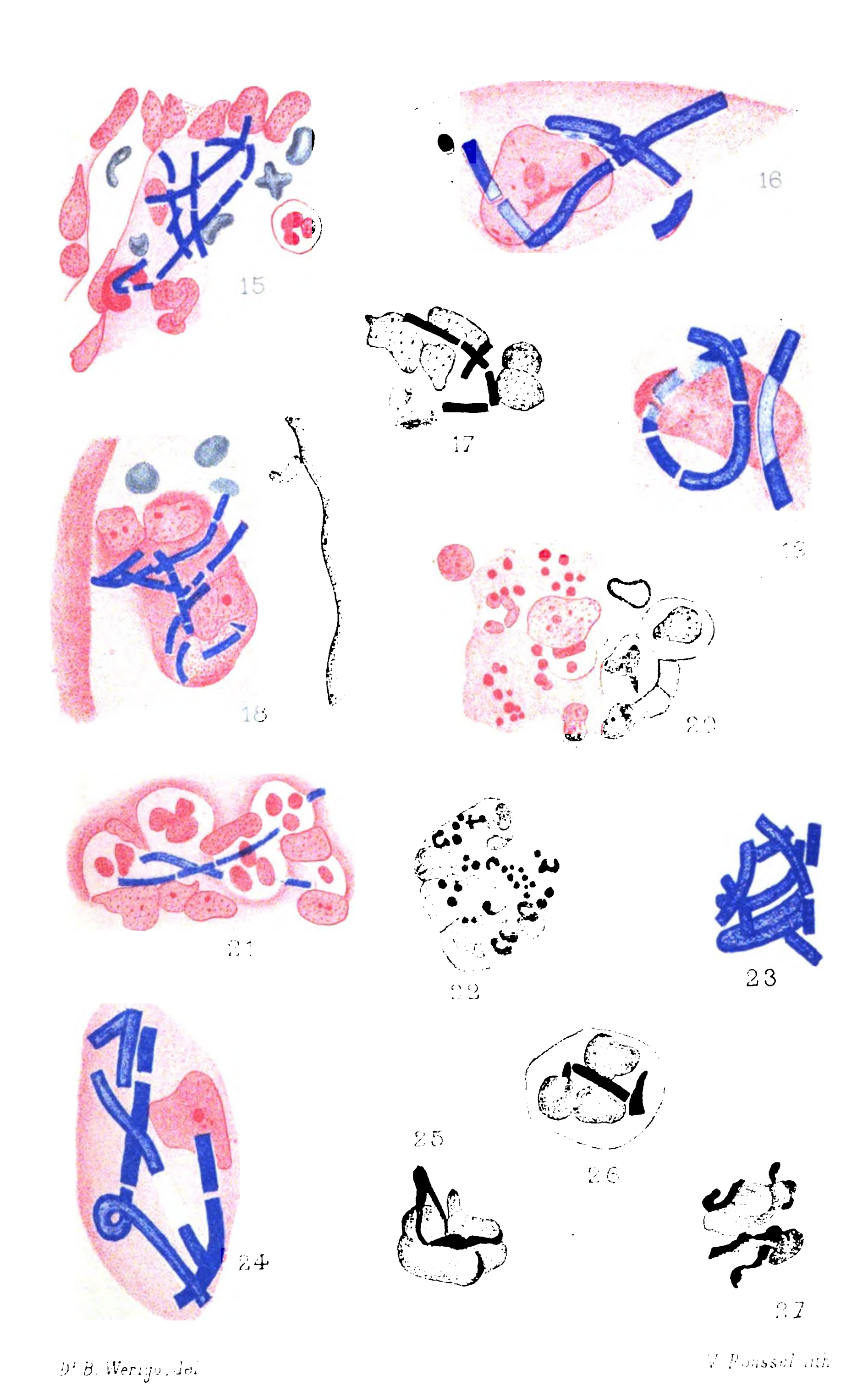
Dr B Werigo, del

V. Roussel lith

Imp. A Lafontaine & Fils Paris.



Dr B Wengo, del
V Roussel lith
Imp A Lafontaine & Fils, Paris



Dr B. Wergo, del. V. Roussel, lith.

Imp. A. Lafontaine & Fils, Paris.

8me ANNÉE FÉVRIER 1894. N° 2.

ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

TUBERCULOSE EXPÉRIMENTALE DU REIN

PAR M. LE Dr A. BORREL.

(Travail du laboratoire de M. METCHNIKOFF à l'Institut Pasteur.)

Dans un travail antérieur sur la tuberculose pulmonaire expérimentale, nous avons été amené à distinguer deux stades bien distincts dans le processus tuberculeux pulmonaire obtenu par injection veineuse.

Immédiatement après l'inoculation, nous avons vu les bacilles incorporés par les leucocytes polynucléaires et arrêtés dans les capillaires du poumon, où ils donnent lieu à la formation de *tubercules d'inoculation* dont nous avons étudié la genèse rapide.

Dans une seconde période, consécutive à la caséification des tubercules primaires, et qui, chez le lapin, commence vers le vingtième jour, nous avons constaté l'envahissement du système lymphatique pulmonaire. — Cette seconde période de la tuberculisation se traduit histologiquement par l'éruption d'une foule de jeunes tubercules dans les voies lymphatiques : il se fait en certains points de véritables stases cellulaires dans la circulation de retour.

Par l'injection dans la veine de l'oreille, le poumon est l'organe de choix, si l'on veut établir facilement et d'une façon rigoureuse la chronologie des modifications consécutives à la pénétration des bacilles, et la réalité des deux stades de la tuberculisation.

Il n'en est pas de même pour les autres organes avec la

tuberculose humaine. — L'autopsie des animaux, sacrifiés jour par jour, montre dans le poumon un semis abondant de granulations tuberculeuses, bien visibles macroscopiquement dès le cinquième jour, tandis que le foie, les reins paraissent indemnes, ou ne présentent que de rares tubercules : le poumon joue donc le rôle d'un filtre qui arrête la plupart des bacilles.

Il n'est pas possible d'étudier d'une façon certaine les premiers stades de l'infection dans ces organes, comme nous l'avons fait dans le poumon. — Par l'injection veineuse, on n'est jamais sûr de réaliser l'infection du rein, par exemple, ou plutôt de retrouver sur les coupes les rares bacilles qui ont échappé au filtre pulmonaire et ont infecté primitivement le rein par la voie artérielle.

L'étude de la tuberculose rénale nous montrera que cette infection primitive se produit pourtant dans la majorité des cas.

Nous verrons en effet, vers le vingtième jour de l'inoculation par la veine de l'oreille, apparaître dans le rein une éruption granulique de tubercules ; mais l'étude histologique de ces granulations nous permettra d'affirmer qu'elles ne correspondent nullement à l'infection primitive ; qu'elles constituent dans le rein des tubercules secondaires absolument comparables aux granulations secondaires lymphatiques du poumon. Comme dans le poumon, elles sont la preuve d'une dissémination récente de bacilles par la voie de retour, consécutive à la caséification de tubercules primaires plus ou moins nombreux dispersés dans chaque organe par l'inoculation expérimentale.

Puisque l'injection dans la veine de l'oreille ne nous permet pas d'étudier, d'une façon certaine, le mode de formation des tubercules primitifs du rein, il faudra pour cette étude employer une méthode d'inoculation qui évite le filtre pulmonaire.

Nous n'avons pas cru devoir utiliser le procédé, préconisé par MM. Kostenisch et Volkow[1], de l'inoculation par piqûre directe du rein à travers les parois lombaires : il nous a paru différer par trop des voies naturelles de l'infection, comme le font remarquer les auteurs eux-mêmes. De plus, par la lésion du rein qu'ils produisent, MM. Kostenisch et Volkow superposent au processus tuberculeux simple un processus de réparation intense qui doit compliquer beaucoup et tout à fait inutilement les

1. *Archives de Médecine expérimentale*, 1892.

phénomènes. Nous avons introduit les bacilles par la voie artérielle, afin de reproduire autant que possible les conditions ordinaires probables de l'infection rénale primitive.

Avec une canule mousse, par la carotide du lapin, il est facile d'arriver à la crosse aortique et de pousser l'injection directement dans l'aorte; on évite, en comprimant l'autre carotide, le retour possible des bacilles par cette voie.

A chaque lapin, j'ai injecté deux centimètres cubes d'une dilution trouble de culture sur gélose, broyée soigneusement et ne contenant pas de grumeaux bacillaires.

Malgré cette injection directe, à cause de la grande surface circulatoire des organes de la cavité abdominale, je dois dire que l'étude des premiers stades de l'infection tuberculeuse du rein est bien faite pour exercer la patience de l'observateur.

Peu de bacilles vont aux reins, et souvent on doit faire de nombreuses coupes pour les rencontrer.

L'étude comparative des reins des animaux infectés par les deux procédés : injection aortique, injection veineuse, est des plus intéressantes; elle nous permettra de pénétrer exactement le mécanisme de l'infection tuberculeuse, et de dissocier expérimentalement les deux formes de tuberculose bien établies par les anatomo-pathologistes :

1° Tuberculose primitive, à localisation glomérulaire ou corticale prédominante;

2° Tuberculose granulique disséminée dans toutes les parties du rein, à localisation péri-vasculaire prédominante.

Dans les deux cas, nous verrons que le processus tuberculeux est toujours interstitiel, que les seuls éléments actifs du tubercule sont des éléments lymphatiques, que les éléments différenciés de l'organe, et l'épithélium rénal en particulier, ne jouent aucun rôle dans la formation des tubercules.

Pour tous les détails de la technique histologique, je renvoie à mon précédent travail (ces *Annales*, août 1893).

La tuberculose rénale a été particulièrement étudiée par les anatomo-pathologistes, et bien des constatations intéressantes ont été faites.

Pour Virchow[1], le tubercule du rein est essentiellement cons-

1. *Traité des tumeurs*, t. III, 21e leçon.

titué par une prolifération lymphoïde du tissu conjonctif; les éléments cellulaires de l'organe ne subissent qu'une atrophie simple ou une nécrose. Pour lui, c'est toujours le tissu conjonctif qui est la gangue où se développent les tubercules, et le tubercule, *néoplasie pauvre,* résulte de la prolifération conjonctive.

D'après Arnold[1], les tubercules miliaires rénaux chez l'homme comprennent les canalicules rénaux, entourés par des zones de tissu infiltré de cellules lymphoïdes. Les canalicules, dont la lumière est tantôt normale, tantôt augmentée, sont écartés les uns des autres, leur épithélium est souvent trouble et gonflé; dans leur lumière, on voit des masses granuleuses ou hyalines. Quelques canalicules sont complètement remplis de cellules. Les cellules épithélioïdes sont souvent en karyokinèse.

D'après cette description, on peut voir qu'Arnold a étudié surtout des granulations miliaires complètement développées, et en a donné une description très exacte.

Rilliet et Barthez constatent l'absence de localisation des granulations miliaires : *Les deux substances corticale et médullaire sont atteintes en même temps... Au microscope, on les trouve non seulement disséminées le long des vaisseaux, mais affectant les rapports les plus intimes avec les différentes parties du rein, sans ordre et presque au hasard, comme si l'organe avait été criblé de grains de plomb.*

Brault[2] remarque, dans les granulations miliaires du rein, la présence de nombreuses cellules lymphatiques et de cellules géantes occupant les espaces intercanaliculaires.

L'étude *anatomo-pathologique* des lésions de la tuberculose rénale ne peut évidemment pas résoudre la question du mode de formation du tubercule, et de la succession des phénomènes consécutifs à la pénétration des bacilles dans le rein.

La méthode expérimentale seule peut permettre d'étudier la genèse des granulations, si bien décrites d'ailleurs par les anatomo-pathologistes.

Baumgarten[3] est le premier qui se soit occupé du mode de formation du tubercule expérimental dans le rein.

Après le poumon, dit Baumgarten, c'est le rein qui est

1. *Über Nierentuberculose.*
2. *Traité de médecine* (CHARCOT et BOUCHARD). Tuberculose rénale.
3. *Über Tuberkel und Tuberkulose.*

l'organe d'abord atteint par la tuberculose métastatique consécutive à l'inoculation dans la chambre antérieure.

Le premier phénomène que provoque la présence des bacilles est une karyokinèse des cellules fixes de l'épithélium des tubes urinifères, de l'endothélium des capillaires, des éléments de la paroi du glomérule. Plus tard se produisent les cellules épithélioïdes, et avec une telle intensité dans l'épithélium des canaux urinifères que ceux-ci s'obstruent complètement. La prolifération des cellules fixes constitue pour lui le processus tuberculeux prédominant. Dans sa figure 12, planche IV, Baumgarten donne trente-trois figures de karyokinèse au niveau d'un seul tubercule.

Dans un travail beaucoup plus récent (*l. c.*), MM. Kostenisch et Volkow veulent confirmer les données de Baumgarten.

Avec le procédé d'inoculation du rein par piqûre directe, ces savants constatent, dans les moments qui suivent l'infection (trois heures), une leucocytose polynucléaire intense.

Quelquefois les bacilles paraissent renfermés dans les leucocytes, d'autres fois, et le plus souvent, ils ne paraissent que juxtaposés.

Au bout de vingt-quatre heures, ils constatent des figures de karyokinèse dans les cellules des canalicules, et des phénomènes d'altération, ce qui n'a rien d'étonnant, étant donné le mode d'inoculation. A la même époque, ils voient apparaître des noyaux pâles de forme variable entre les canalicules. Ces auteurs n'indiquent pas l'origine des noyaux pâles, qui semblent pourtant jouer un grand rôle, puisque, au deuxième jour, ces cellules à noyau pâle, rond ou allongé, rappellent tantôt les cellules de l'épithélium rénal, tantôt les cellules éptihélioïdes.

Au troisième jour (1[re] série), *entre les canalicules, on trouve par endroits de nombreux noyaux plus ou moins ovalaires : dans quelques-uns de ces noyaux, on voit des figures de division.....*

Rarement le protoplasma est bien développé autour de ces noyaux : quelquefois on trouve des bacilles dans ce protoplasma devenu plus abondant ; on obtient ainsi des formes de transition vers les cellules épithélioïdes.

Les cellules épithélioïdes dérivent donc, d'après cette description, des cellules intercanaliculaires qui apparaissent au deuxième jour déjà, et dont les auteurs n'indiquent pas l'origine. On ne comprend pas pourquoi, dans leurs conclusions, MM. Kostenisch et Volkow sont autorisés à dire que les cellules épithé-

lioïdes résultent de la prolifération des éléments cellulaires fixes des tissus.

Peut-être faut-il attribuer à la complexité des lésions obtenues par ces auteurs, le manque de clarté de leurs constatations, appuyées par des dessins trop sommaires.

TUBERCULOSE RÉNALE PRIMITIVE.

Le mode de formation des tubercules primitifs par injection artérielle dans le rein est absolument comparable au mode de formation des tubercules initiaux dans le poumon, comparable à la formation des mêmes tubercules dans le foie, lorsqu'on réalise l'infection directe de cet organe par les veines mésentériques. C'est un processus d'ordre général et qui doit se retrouver au début de toute infection d'un organe par le système vasculaire sanguin.

Dans le rein, les bacilles arrivant par l'artère rénale sont arrêtés dans les capillaires glomérulaires ou dans les capillaires de la substance corticale; ils y déterminent une accumulation de nombreux leucocytes polynucléaires dès les premiers moments de l'infection.

La localisation de beaucoup la plus fréquente est la localisation glomérulaire. Dans nos coupes, comprenant une section totale du rein dans son plus grand diamètre, on ne rencontre pas toujours des bacilles, et il est nécessaire souvent de faire de nombreuses coupes pour rencontrer les bacilles que l'on a injectés.

Je n'ai jamais constaté la présence de bacilles dans la substance des pyramides, ce qui peut déjà nous faire supposer que la substance corticale, où la circulation est forcément ralentie, doit être le point le plus favorable à l'arrêt des bacilles. Baumgarten, dans sa *Tuberculose rénale*, note cette même localisation glomérulaire, et les anatomo-pathologistes ont toujours constaté le siège presque exclusif des tubercules primitifs du rein dans la substance corticale. L'expérience confirme absolument ces données.

Le plus souvent on remarque dans un glomérule la dilatation

d'une anse capillaire, et la présence d'un certain nombre de leucocytes polynucléaires contenant les bacilles.

La même disposition se retrouve dans les capillaires intercanaliculaires de la substance corticale, mais beaucoup plus rarement.

Baumgarten constate que les bacilles ayant pénétré dans le rein s'arrêtent, soit dans les replis glomérulaires, soit dans l'épithélium des tubes contournés, où ils arrivent *vraisemblablement* par les capillaires voisins. On ne voit pas très bien comment un bacille arrivant par un capillaire peut passer dans l'épithélium du canalicule. Bien que la distance ne soit pas grande anatomiquement, les deux formations sont on ne peut plus éloignées par leurs fonctions bien distinctes, et les bacilles introduits dans le rein ne nous paraissent pas suivre des voies quelconques déterminées par des relations de bon voisinage de capillaire sanguin à canalicule urinifère.

Dans le rein comme dans les autres organes, les épithéliums ont leurs fonctions bien distinctes, et dans le rein, comme partout ailleurs, il existe des éléments cellulaires chargés des relations de l'organisme avec les microbes pathogènes. Nos constatations nous permettront d'établir qu'il n'en est pas autrement pour le bacille tuberculeux. Nous n'avons jamais rencontré de bacilles dans l'épithélium des tubes glandulaires.

Si nous poursuivons en effet le sort des bacilles introduits dans le rein, et que nous avons vus saisis à la première heure par les leucocytes polynucléaires, nous constaterons vers le troisième jour l'intervention de nouveaux éléments.

Sur les coupes à cette époque, nous retrouvons les bacilles identiquement situés dans une anse dilatée d'un capillaire glomérulaire. Parmi les leucocytes polynucléaires, on remarque l'apparition d'éléments mononucléaires en nombre plus ou moins considérable. Ces éléments ont des noyaux ovalaires, échancrés, étirés, un protoplasma granuleux contenant les bacilles.

Une pareille granulation est dessinée figure 1, planche IV : on ne voit pas, dans le capillaire dilaté, de leucocytes polynucléaires, encore si fréquents à cette période (troisième jour) dans les autres jeunes granulations glomérulaires, mais j'ai choisi ce tubercule à cause de sa très grande simplicité.

Dans les capillaires intercanaliculaires, les mêmes phéno-

mènes peuvent être étudiés. On rencontre par endroits des éléments cellulaires intercanaliculaires isolés ou groupés, contenant des bacilles. Sur des coupes un peu épaisses, la véritable situation des bacilles pourait être méconnue. Il n'est pas rare en effet de rencontrer des éléments cellulaires mononucléaires contenant des bacilles qui sont comme étalés à la surface d'un canalicule rénal; les bacilles contenus dans la cellule intercanaliculaire peuvent paraître à première vue situés dans les cellules épithéliales du rein.

De plus, à cause de la grande extension que prennent parfois les prolongements protoplasmiques de la cellule intercanaliculaire, le noyau n'est pas toujours dans le même plan et peut même être absent sur la coupe.

Il n'est pas inutile d'insister sur toutes ces particularités, qui pourraient donner lieu à des erreurs d'interprétation.

La figure 2 planche IV, montre des groupes de cellules, intercanaliculaires qui s'insinuent à travers les canalicules, et dont plusieurs contiennent des bacilles. Ces éléments cellulaires, *a*, *a'*, à gros noyau vésiculeux, plus ou moins chromatique, souvent échancré, se distinguent très bien du noyau fusiforme des cellules connectives et de l'endothélium vasculaire; il est impossible de les confondre avec les noyaux de l'épithélium rénal. La figure est prise au voisinage d'un amas considérable de cellules lymphatiques, qui commence en *b* et qui constitue déjà une véritable granulation tuberculeuse au sixième jour de l'inoculation. Autour de ce nodule, les tubes du rein sont simplement écartés; la figure nous montre les tubes rénaux voisins absolument normaux. Dans le nodule lui-même, au centre, les cellules présentent un protoplasma abondant, fibrillaire, et contiennent beaucoup de bacilles; à la périphérie sont accumulées de jeunes cellules lymphatiques à petit noyau très chromatique, quelques-unes sont en voie de division.

La figure 2 nous montre très bien le processus d'envahissement des parties voisines par arrivée de nouveaux éléments. — La présence de pareilles cellules à cette période est impossible à comprendre si on n'admet pas une accumulation de cellules migratrices en ce point. Nous voyons en effet que les tubes contournés sont absolument normaux, et que les cellules connectives se distinguent très bien.

Dans le tubercule en voie de formation, nous avons signalé

deux figures de division : il n'y a rien d'étonnant à ce que les cellules lymphatiques se multiplient dans les points où elles se fixent, aussi bien que dans les ganglions lymphatiques où elles ont pris naissance. D'ailleurs le nodule tuberculeux dans son ensemble donne tout à fait l'image d'un follicule lymphatique élémentaire.

La figure 1, planche V, reproduit un tubercule dans la substance corticale vers le vingtième jour de l'inoculation, avant le début de la caséification. Le processus interstitiel y est des plus manifestes. En *a*, *a*, on remarque la section de tubes contournés inclus dans le centre du tubercule : les cellules de l'épithélium ont complètement perdu le type caractéristique de la cellule glandulaire du tube contourné. On n'y retrouve pas la striation caractéristique, bien visible encore dans les tubes de la périphérie. De plus la lumière des tubes est considérablement réduite ; leur section rappelle la section des tubes urinifères dans la substance pyramidale. Nous retrouverons le même type de transformation cellulaire des épithéliums dans les tubercules plus développés.

Les tubes contournés, à la périphérie, sont considérablement écartés par l'infiltration du tissu interstitiel. Un fait important à noter est la pénétration d'éléments migrateurs dans la lumière des tubes contournés : ces éléments se distinguent par la coloration beaucoup plus intense du noyau, qui est petit et très chromatique. Cette pénétration s'explique par la destruction en certains points de la paroi des tubes ; elle pourrait dans bien des cas donner lieu à de fausses interprétations.

Dans le tubercule dessiné planche V, on ne relève aucune figure de karyokinèse dans l'épithélium des tubes contournés au voisinage de l'infiltration interstitielle. Il n'est pas rare pourtant de rencontrer des figures de division de l'épithélium dans des tubercules semblables. (Fig 1, pl. VI.) Mais de pareilles figures de division ne contribuent en rien à la formation des tubercules. La prolifération des cellules de l'épithélium dans l'intérieur des tubes n'a nullement la signification que lui attribue Baumgarten. Il est vrai que, jamais, je n'ai rencontré plus de deux ou trois figures karyokinétiques dans un même tubercule. Baumgarten en figure trente-trois dans un seul tubercule. Son dessin donne un véritable fourmillement de divisions.

Dans le tissu interstitiel du tubercule planche V, j'ai relevé exactement deux figures de karyokinèse *c*, *c*.

Au centre de la granulation, les cellules offrent la régularité caractéristique des cellules épithélioïdes : les noyaux sont volumineux, peu chromatiques, le protoplasma est abondant, fibrillaire ou finement granuleux. A la périphérie, au contraire, les cellules sont généralement plus petites, le noyau est petit, très chromatique : le protoplasma est peu abondant. Les dimensions du dessin permettent de voir tout l'ensemble du processus et l'étendue de l'infiltration intercanaliculaire. Tout autour, le tissu rénal non visible sur la figure est normal ; on ne trouve entre les tubes que de rares cellules connectives ou endothéliales.

Dans ce tubercule déjà ancien (20 jours), on pourrait objecter que l'infiltration cellulaire provient d'une multiplication sur place des éléments connectifs, puisque on constate des figures de division dans les cellules interstitielles (*l'épithélium rénal étant mis hors de cause, car il me paraît impossible de soutenir qu'il entre pour une part quelconque dans la formation tuberculeuse*). C'est l'idée de Virchow, qui caractérise le tubercule rénal comme une prolifération lymphoïde du tissu interstitiel.

Mais l'étude quotidienne de la genèse des granulations tuberculeuses dans le rein ne permet pas d'accepter une pareille interprétation. Nous avons constaté l'apparition précoce d'éléments intercanaliculaires, bien distincts des cellules connectives ou endothéliales, à une époque où les tubes du rein sont encore normaux. (Fig. 2, pl. IV.) Nous avons déjà dit quelle était pour nous la signification des figures de division que l'on rencontre ultérieurement dans les cellules interstitielles ; d'ailleurs ces figures karyokinétiques sont relativement rares dans nos préparations et ne suffisent pas à expliquer l'accumulation cellulaire considérable qui constitue les jeunes granulations. Dans le rein comme dans le poumon, les cellules du tubercule sont des éléments mobiles fixés, et ne paraissent pas résulter d'une prolifération des cellules fixes connectives ou endothéliales préexistantes. La granulation tuberculeuse est essentiellement interstitielle et d'origine lymphatique.

Les cellules épithélioïdes des granulations ont toujours la même origine ; elles résultent de l'évolution naturelle et du développement de la cellule lymphatique fixée en un point quel-

conque de l'organisme. Elle se développe en ces points aussi bien que dans les ganglions lymphatiques où elle a pris naissance.

Dans certains tubercules du rein plus anciens (1 mois), on trouve un type de cellule épithélioïde bien spécial, dont le protoplasma est rempli de granulations colorables par la méthode de coloration des bacilles. Certains tubercules sont entièrement constitués par des cellules épithélioïdes de cette catégorie : le fait est assez intéressant, car on retrouve chez les mêmes animaux le même type cellulaire dans la partie centrale des follicules lymphatiques. Je l'ai trouvé d'une façon constante dans la masse ganglionnaire abdominale connue chez le lapin sous le nom de *pancréas d'Aselli*. Dans le ganglion, l'origine de pareilles cellules n'est pas douteuse: elles résultent du développement de la cellule lymphatique, qui se charge de granulations dont la nature nous est encore inconnue. Ces cellules sont phagocytes et contiennent presque toujours des bacilles. Puisqu'on retrouve dans le rein des granulations tuberculeuses entièrement constituées par des cellules identiques, on ne peut s'empêcher d'y voir une preuve directe de l'identité d'origine dans les deux cas.

Cette question de l'origine des cellules tuberculeuses devient très simple lorsque, au lieu de s'adresser à des organes tels que le poumon, le rein, on étudie la formation du tubercule dans l'épiploon. Dans l'épiploon, l'étude de la granulation tuberculeuse est très facile et très instructive, parce qu'elle montre le processus tuberculeux dans son ensemble et pris sur le vif. Par l'injection intra-péritonéale de bacilles tuberculeux, on détermine d'une façon constante la formation immédiate de nombreuses granulations tuberculeuses dans la cavité abdominale, avec localisation prédominante sur l'épiploon.

Dès le troisième jour de l'inoculation, sur l'épiploon fixé et coloré par les procédés ordinaires applicables à la coloration du tissu et des bacilles, on distingue par places l'accumulation de cellules lymphatiques, leucocytes polynucléaires et mononucléaires, entourant les bacilles et envoyant des prolongements dans leur direction. Dans les capillaires voisins, on remarque très bien tous les stades d'une diapédèse abondante : on peut suivre avec la plus grande facilité la réaction de l'organisme dans son ensemble, et la succession des phénomènes qui aboutissent à la

concentration d'éléments mobiles, à la formation des granulations tuberculeuses sans intervention aucune des éléments fixes.

Cette étude de l'infection tuberculeuse par la voie péritonéale fera l'objet d'un travail ultérieur ; elle nous donnera une démonstration directe des phénomènes, qu'il est évidemment plus difficile d'analyser sur des coupes. Nous arrivons toujours à cette conclusion : le tubercule est une accumulation de cellules lymphatiques.

Dans le rein, malgré la complexité plus grande des phénomènes, on peut aussi bien se convaincre de la vérité de cette conclusion. Il est évident d'autre part que le processus tuberculeux ne s'établit pas sans déterminer des modifications plus ou moins profondes dans les éléments propres de l'organe. Dans le voisinage immédiat de l'infiltration tuberculeuse, il n'est pas rare de rencontrer des figures de division karyokinétiques, indice d'un processus irritatif de voisinage, à côté de phénomènes de dégénération et de nécrose. Quelquefois les tubes du rein sont simplement écartés, mais le plus souvent un certain nombre se trouvent inclus dans la granulation. Ce fait ne permet pas de conclure à une participation quelconque de l'épithélium rénal à la formation tuberculeuse. Les tubes du rein semblent faire partie intégrante du tubercule, parce qu'il ne peut en être autrement, étant donnée la structure même de l'organe. Peu à peu les éléments glandulaires finissent par se nécroser, après une période d'irritation et de multiplication ; les éléments lymphatiques finissent par envahir complètement la portion du tube comprise dans le jeune tubercule, et le tout aboutit à une caséification plus ou moins rapide. Il est essentiel de distinguer dans la coupe d'une granulation tuberculeuse, d'une part les éléments dont la présence constitue le processus essentiel, et, d'autre part, les phénomènes d'irritation ou de dégénérescence qui en sont la conséquence. Virchow avait très bien distingué les deux processus en caractérisant le tubercule du rein comme une prolifération lymphoïde du tissu interstitiel. Nous avons vu quelle est pour nous la signification qu'on doit attribuer à cette expression de prolifération lymphoïde.

TUBERCULOSE GRANULIQUE DU REIN.

L'étude que nous venons de faire du tubercule primitif rénal ne constitue pas à notre avis toute la tuberculose rénale, et dans le rein même nous avons à distinguer le type métastatique de la granulation tuberculeuse consécutive à la dissémination des bacilles par la voie lymphatique. La granulie aiguë chez l'homme est le type de cette forme de la tuberculose.

Dans le rein, les descriptions des granulations miliaires données par les anatomo-pathologistes ne nous laissent aucun doute sur l'identité du processus granulique étudié par les anatomo-pathologistes et du processus granulique obtenu expérimentalement. La méthode expérimentale a l'avantage de nous faire assister aux premiers débuts du processus.

Par injection de cultures tuberculeuses dans le système veineux, nous avons constaté dans le poumon une éruption de granulations lymphatiques secondaires périvasculaires, péribronchiques, vers le vingtième jour de l'inoculation; nous retrouverons dans les reins des mêmes animaux, à la même période, le même type de jeunes granulations tuberculeuses lymphatiques à localisation périvasculaire qui constitue pour nous, dans la tuberculose, le véritable processus granulique des auteurs : *le tubercule de la granulie généralisée.*

L'étude histologique du rein à cette époque permet d'établir la signification de pareils tubercules.

En effet, nous avons signalé dans la première partie de ce travail la localisation exclusive des tubercules primitifs du rein dans la substance glomérulaire et corticale.

Le processus tuberculeux granulique ne montre pas de localisation prédominante dans telle ou telle partie du rein. Ce point a été très bien établi par les travaux de Rayer, Rilliet et Barthez.

Il n'y a pas de localisation constante (disent ces auteurs) *des granulations tuberculeuses dans la tuberculose miliaire. Les deux substances corticale et médullaire sont atteintes en même temps ; quelquefois les pyramides contiennent plus de tubercules que la région du labyrinthe ; à l'examen microscopique on les trouve non seulement disséminés le long des vaisseaux, mais affectant les rapports les plus*

intimes avec les diverses parties du rein, sans ordre et presque au hasard, comme si l'organe avait été criblé de grains de plomb.

C'est la description on ne peut plus exacte de notre tuberculose granulique rénale expérimentale.

Nos expériences comparatives montrent que l'éruption granulique au vingtième jour de l'inoculation ne correspond nullement à une infection primitive directe, puisque l'injection directe par la voie aortique de deux centimètres cubes de culture aurait donné, non pas une tuberculose granulique, mais une tuberculose primitive du rein à localisation corticale.

De plus, l'étude comparative du processus pulmonaire et du processus rénal nous montre que cette granulie est un processus secondaire dans le rein même, consécutif à la dissémination de bacilles par la voie lymphatique, identique à l'éruption granulique que nous avons signalée dans le poumon, lors de la généralisation lymphatique,

La figure 3, planche VI, représente le début d'un tubercule périartériel dans la région des glomérules : on voit en *a* la coupe longitudinale d'une artère rénale ; le jeune tubercule est comme greffé sur la paroi du vaisseau, les tubes contournés voisins sont refoulés par l'accumulation cellulaire constituant le tubercule, en *e* on voit les cellules connectives normales ; il est de toute évidence que le tissu propre du rein ne prend aucune part à la néoformation tuberculeuse. En *c*, on distingue un trajet lacunaire rempli d'éléments lymphatiques, et la figure dans son ensemble nous donne on ne peut mieux l'explication du mode de formation du jeune tubercule : les cellules lymphatiques arrivent par les espaces lymphatiques voisins, s'accumulent et se transforment sur place en cellules épithélioïdes. En *b*, une figure de division.

C'est le processus que nous avons établi pour le mode de formation du tubercule lymphatique pulmonaire, et l'identité des deux ordres de granulations paraît on ne peut plus évidente.

Ce type de tubercule rénal est de beaucoup le plus fréquent dans la granulie, et nous avons vu la constatation de ce fait par les descriptions anatomo-pathologiques : c'est le type le plus net et le plus caractéristique du tubercule lymphatique.

Le plus souvent, dans ces tubercules granuliques au début, on ne trouve que très peu de bacilles, un, deux, par tubercule et

par coupe. L'intensité de la réaction cellulaire paraît hors de proportion avec le nombre de bacilles. Ce caractère les différencie très bien dans nos coupes, où les tubercules d'inoculation en contiennent beaucoup.

Les tubercules granuliques disséminés dans le tissu du rein, soit dans la substance corticale, soit dans la zone des pyramides, présentent identiquement les mêmes caractères, et sont constitués par une infiltration de cellules lymphatiques entre les tubes du rein. La figure 2, planche VI, représente un tubercule pris à la limite de la zone corticale ; on distingue encore très bien les tubes du rein au centre de la granulation; pas de figures de division dans les cellules de l'épithélium, une figure de karyokinèse dans les cellules interstitielles. Les tubes du rein subissent un véritable processus d'atrophie et ne jouent aucun rôle actif. On constate la présence des deux bacilles qui ont suffi à déterminer tout le processus réactionnel.

La figure 3, planche IV, est intéressante parce qu'elle nous montre le premier début de tubercules métastatiques lymphatiques. En *a*, on constate, dans un conduit qui n'est sûrement pas un tube du rein, mais qui pourrait bien être un conduit lymphatique, l'accumulation de cellules qui contiennent des bacilles : en *a'* même accumulation avec un bacille ; dans le conduit *a''*, deux cellules lymphatiques et deux bacilles.

Le tissu du rein environnant est normal, on distingue très bien la section des tubes droits, *c*, la lumière *d* des capillaires sanguins remplis de globules ; en *e*, *e'*, *e''*,on note la présence d'éléments cellulaires libres dans des lacunes du tissu. Cette figure montre, à mon avis, le tout premier stade de l'arrêt des bacilles en un point de la circulation de retour.

On trouve une figure de karyokinèse dans l'épithélium d'un tube droit *b'*.

Si l'on étudie les stades plus avancés des granulations tuberculeuses du rein, les phénomènes deviennent beaucoup moins nets, et il est souvent fort difficile de distinguer la véritable nature des éléments cellulaires qui entrent dans leur constitution. Une cellule épithélioïde adulte ne diffère pas beaucoup d'une cellule de l'épithélium rénal plus ou moins altéré : la véritable origine peut en être méconnue, mais l'étude quotidienne du rein des animaux sacrifiés nous permet de saisir les premiers stades

de la généralisation dans le rein lui-même. Dans ces tubercules, au début, il est facile de saisir la véritable signification du processus tuberculeux métastatique.

De plus, le moment d'apparition de ces jeunes granulations, leur siège surtout périvasculaire, leur pauvreté relative en bacilles, les différencient très bien des tubercules primitifs obtenus par injection aortique. Tous ces caractères nous permettent d'affirmer ici, comme dans le poumon, la réalité de deux stades successifs dans l'infection tuberculeuse lorsque les bacilles pénètrent dans les organes par le courant sanguin. Dans la granulie expérimentale obtenue par injection veineuse, la très grande majorité des granulations miliaires appartiennent au type du *tubercule lymphatique périvasculaire*. La forme granulique généralisée de la tuberculose nous apparaît donc ici comme une généralisation, par la voie de retour, d'un processus tuberculeux primitif disséminé dans tous les organes par la voie sanguine. En d'autres termes, on doit distinguer dans la genèse de la granulie aiguë une période d'incubation qui correspond à l'évolution de tubercules primitifs disséminés dans tous les organes par le courant sanguin.

Cette dissémination est obtenue dans nos expériences par injection dans le système circulatoire. L'anatomie pathologique montre que cette injection peut se produire spontanément dans l'organisme tuberculeux, par rupture de paroi vasculaire, et pénétration directe de colonies bacillaires dans la grande circulation (Weigert).

La caséification des tubercules primaires, qui se produit vers le vingtième jour chez le lapin, amène la dissémination rapide par le système lymphatique.

Dans les deux cas, nous avons vu que les cellules tuberculeuses sont des cellules d'origine lymphatique « accourues du dehors », suivant l'expression de M. Metchnikoff.

Il est bien évident que ces éléments lymphatiques peuvent se multiplier dans les points où ils se fixent. La constatation de quelques figures de karyokinèse dans les éléments de la granulation ne suffit pas à expliquer la genèse du processus tuberculeux. L'épithélium du rein en particulier ne joue aucun rôle actif; il ne subit qu'un processus d'irritation de voisinage, d'atrophie ou de nécrose.

Virchow avait très bien caractérisé le tubercule du rein comme une production interstitielle.

Nos constatations expérimentales, ici comme dans le poumon, nous éloignent beaucoup de la conception du tubercule tel que l'a compris Baumgarten. Pour lui, la karyokinèse des cellules fixes et de l'épithélium rénal est le processus tuberculeux dominant.

Nous avons vu quel était pour nous le rôle de la karyokinèse dans le tubercule et sa signification.

Le tubercule dans son ensemble consiste dans une accumulation de cellules lymphatiques. La granulation tuberculeuse est une production lymphatique identique dans tous les organes.

Notre travail, ici comme dans le poumon, est une confirmation de la conception du tubercule exposée depuis longtemps par M. Metchnikoff.

EXPLICATION DES PLANCHES

PLANCHE IV.

Fig. 1. — Portion d'un glomérule du rein au troisième jour de l'inoculation par la carotide.

Les bacilles sont arrêtés en *a*, dans un capillaire dilaté. Les éléments mononucléaires contiennent les bacilles. *b*, tubes contournés environnants, *c*, capsule du glomérule, détachée par places.

Fig. 2. — La coupe dans la substance corticale au sixième jour de l'inoculation carotidienne est prise au voisinage d'une jeune granulation tuberculeuse interstitielle qui commence en *b*. Elle montre en *a*, *a'* la présence d'éléments interstitiels nombreux, dont quelques-uns contiennent des bacilles; les tubes du rein sont absolument normaux.

Fig. 3. — Début d'un tubercule métastatique secondaire dans la substance des pyramides au vingtième jour de l'inoculation *veineuse*.

Dans des cavités très bien délimitées *a*, *a'*, *a''*, qu'il est facile de distinguer des tubes glandulaires, on note la présence d'éléments cellulaires, contenant des bacilles.

Les capillaires voisins sont injectés naturellement.

La figure dans son ensemble montre le premier stade de la formation d'un tubercule métastatique par concentration d'éléments mobiles, bien isolés dans les mailles d'un tissu alvéolaire, *e*, *e'*, *e''*. En *b*, une figure de karyokinèse interstitielle. En *b'*, une figure de division dans un tube droit.

PLANCHE V.

Fig. 1. — Le dessin montre tous les détails d'un tubercule du rein développé dans la substance corticale au vingtième jour de l'inoculation.

En *a*, *a'*, dans le centre de la formation tuberculeuse, on remarque la section de tubes contournés en voie d'atrophie; les cellules n'offrent plus la striation caractéristique de la cellule du tube contourné; elles sont légèrement granuleuses.

La limite des tubes est parfaitement nette.

La figure dans son ensemble montre le processus de formation du tubercule par infiltration interstitielle, et par écartement des tubes glandulaires.

c, *c'*. Deux figures de division karyokinétique dans le tissu interstitiel.

Pas de figures de division dans les tubes contournés voisins. *d'*, *d''*, *d'''*, bacilles.

e, *e'*. Éléments cellulaires interstitiels périphériques.

PLANCHE VI.

Fig. 1. — La figure représente le début d'une granulation tuberculeuse métastatique au vingtième jour de l'inoculation par la veine de l'oreille.

On remarque en *b* une figure de karyokinèse dans les cellules lymphatiques interstitielles.

En *b'*, une figure de division dans un tube contourné, la division aboutira à la formation de deux cellules glandulaires; le processus tuberculeux est purement interstitiel.

Fig. 2. — Début d'une granulation tuberculeuse métastatique au vingtième jour, prise à la limite de la substance corticale et de la substance des pyramides.

b. Une figure de karyokinèse interstitielle.

Les tubes du rein sont envahis par les cellules lymphatiques et finissent par être complètement détruits.

En *c*, on distingue les limites d'un tube déjà presque complètement détruit.

Fig. 3. — Tubercule lymphatique périartériel au vingtième jour. Ce type de tubercule est le plus fréquent dans la granulie rénale obtenue expérimentalement.

a. Artère.

b. Une figure de division kayrokinétique de cellule lymphatique.

En *c*, on distingue très bien l'indication d'un trajet où sont accumulées de jeunes cellules.

d. Cellules épithéloïdes constituant le centre de la granulation.

En *e*, on distingue les tubes contournés simplement écartés par l'infiltration cellulaire périvasculaire constituant la granulation.

f. Glomérule de Malpighi.

g. Infiltration du tissu avoisinant le tubercule.



SUR UNE MYCOSE INNOMINÉE DE L'HOMME

LA TEIGNE TONDANTE SPÉCIALE DE GRUBY

MICROSPORUM AUDOUINI

PAR R. SABOURAUD

Interne de l'hôpital St-Louis.

En 1843, M. Gruby publia une description microscopique du *microsporum Audouini*, dans un mémoire à l'Académie des sciences [1], et dans un second travail qui date de l'année suivante, il différencia ce parasite de celui de la teigne tondante (trichophytique) avec une précision de détails réellement magistrale pour cette époque[2]. On sait que l'origine cryptogamique des teignes, affirmée pour la première fois dans ces mémoires et dans deux autres du même auteur[3], fut débattue pendant trente ans avant d'être définitivement acceptée. Quand elle passa dans le domaine de l'enseignement médical, les contemporains, peu familiarisés encore avec les techniques microscopiques, avaient déformé les descriptions du premier auteur, à ce point qu'il a fallu, après cinquante ans, découvrir de nouveau ce qui avait été déjà énoncé.

C'est que les premiers mémoires de Gruby, qui émanaient d'un micrographe et non d'un dermatologiste, manquaient d'une description symptomatique suffisante pour que l'on sût exactement à quelle maladie les différents parasites qui étaient décrits correspondaient. Et Gruby avait eu le malheur d'étudier la

1. GRUBY. *Recherches sur la nature, le siège et le développement du Porrigo decalvans ou Phyto-alopécie.* Comptes rendus, Paris, 1843, t. XVII, p. 301.

2. GRUBY. *Recherches sur les cryptogames qui constituent la maladie contagieuse du cuir chevelu décrites sous le nom de Teigne tondante* (Mahon) *Herpès tonsurans* (Cazenave). Comptes rendus, Paris, 1844, t. XVIII, p. 583.

3. GRUBY. *Mémoire sur une végétation qui constitue la vraie teigne.* Comptes rendus, 1841, tome XIII, p. 79. (Ce mémoire concerne la teigne faveuse). *Sur une espèce de mentagre contagieuse résultant du développement d'un nouveau cryptogame dans la racine des poils de la barbe de l'homme.* Comptes rendus. Paris, 1842, t. XV, p. 512.

maladie causée par le *microsporum Audouini* sous le nom de « *Porrigo decalvans* », nom jusque-là réservé à la *pelade*.

Cette confusion de mots a fait répéter par tous les commentateurs, que Gruby avait décrit dans la pelade un parasite cryptogamique qui n'existe pas.

En réalité ce parasite existait, mais non pas dans la pelade; il cause une maladie spéciale, confondue encore aujourd'hui dans le syndrôme de la teigne trichophytique.

Après une longue série d'examens microscopiques et de cultures, pratiqués dans le service de mon éminent et vénéré maître, M. E. Besnier, j'ai séparé de nouveau en 1892 [1] ces deux parasites, sous les noms de *trichophyton megalosporon* et de *trichophyton microsporon*. J'ignorais alors que ce dernier n'était que le *microsporum Audouini*, oublié depuis longtemps.

Et le nom de *trichophyton*, que j'avais conservé à ces deux parasites, montre assez que je croyais entre eux à une parenté étroite, parenté que justifiait l'analogie grossière de leurs lésions.

Je n'avais pas alors observé assez complètement les mœurs cliniques différentes de ces deux mycoses; je n'avais pas remarqué les différences fondamentales qui séparent la morphologie de leur parasite respectif, enfin et surtout la différence de leur structure et de leur classification botanique, pour séparer d'une façon absolue les deux maladies qu'ils déterminent.

Aujourd'hui, je suis en mesure de le faire, et d'affirmer que ce sont deux mycoses, aussi distinctes entre elles que la *trichophytie* est distincte du *favus*, deux maladies qui n'ont de commun que de s'attaquer l'une et l'autre aux cheveux.

Après plusieurs études consacrées aux *trichophytons mégalosporon*, qui causent la trichophytie *vraie*, la trichophytie *de tous sièges*, après la différenciation très incomplète encore des espèces qui semblent exclusives à l'homme, et de celles qui relèvent d'une origine animale [1], je voudrais revenir sur la maladie du cuir chevelu que cause le *microsporum Audouini*.

Je décrirai donc d'abord l'aspect objectif de ses lésions, et

1. Sabouraud. *Contribution à l'étude de la trichophytie humaine.* (*Annales de Dermatologie*, nov. 1892.)

1. Sabouraud. *Annales de Dermatolgie*, nos de février et de juillet, 1893. *Sur les trichophyties à dermite profonde.* (*Annales de l'Instit. Pasteur*, juin 1893.)

la « lésion élémentaire » dont elle s'accompagne toujours. Je reprendrai ensuite l'examen microscopique du cheveu malade, et la description morphologique de son parasite, pour corriger quelques erreurs et des omissions de détail. Je rappellerai ensuite les caractères spéciaux de la culture de ce parasite. Enfin je montrerai comment l'examen mycologique permet d'affirmer que les *trichophytons* et le *microsporum Audouini* n'appartiennent pas à la même famille de mucédinées.

La maladie causée par le *microsporum Audouini* reste encore innominée. On ne peut lui conserver le nom de *trichophytie* puisqu'il perpétuerait la confusion faite jusqu'à ce jour. On ne peut pas davantage lui restituer le nom barbare de « *Porrigo decalvans* », presque inusité de nos jours, mais qui la rapprocherait encore des pelades contagieuses dont le parasite est inconnu. Je l'appellerai donc la *tondante rebelle*, parce que son siège unique est le cuir chevelu et parce qu'elle est la plus grave des teignes, celle dont l'évolution peut durer plusieurs années. Peut-être serait-il juste de la désigner sous le nom de « maladie de Gruby », puisqu'on doit à cet observateur oublié la découverte des parasites de toutes les teignes connues, et que pas une ne porte son nom.

I. — Étude clinique

Si l'on réunit, au hasard, un certain nombre de cas de teignes tondantes, pour séparer de celles qui sont causées par le *trichophyton* vrai (*Trich. megalosporon*), celles qui sont dues au *microsporum Audouini*, on peut voir que ces dernières font environ la moitié du nombre total. La tondante de Gruby est donc une maladie extrêmement fréquente, et cette fréquence ajoute à l'intérêt de son étude.

Au contraire de la trichophytie, la tondante spéciale dont je parle semble débuter, non par l'épiderme, mais par le poil, et quand l'épiderme est atteint, il ne paraît l'être que secondairement au cheveu. Surprendre ce début est difficile : il passe inaperçu le plus souvent. Voici en quoi il consiste :

α) *Lésion pilaire.* Sur le cuir chevelu, environ dans l'étendue que recouvrirait une pièce de 2 francs, chaque cheveu est revêtu, à sa base, sur trois millimètres de hauteur environ,

au-dessus de l'orifice pilaire, par un étui d'un blanc grisâtre : cette gaine semble un prolongement de l'épiderme folliculaire qui aurait accompagné le cheveu dans sa croissance [1].

Cet aspect est tout à fait surprenant : quand on l'a vu une fois, on ne saurait plus le méconnaître ; mais on conçoit qu'une lésion ainsi limitée à la base du cheveu, sans fracture du cheveu, sans déglabration de la plaque, sans lésion épidermique, ne soit pour ainsi dire jamais remarquée.

Un peu plus tard, les cheveux se brisent à des hauteurs différentes (ordinairement à 6 ou 7 millimètres du follicule) ; l'étui pseudo-épidermique de leur base est dissocié, et la plaque malade se couvre de ces débris squameux, lamellaires, blanchâtres (*Pityriasis alba* parasitaire) qui donnent à la plaque son aspect vulgaire, le plus connu. A distance, on dirait que sur les plaques malades, on a répandu de la cendre dans les cheveux.

Si la plaque de tondante continue son évolution sans intervention d'aucune sorte, les cheveux malades, qui sont *fins* et qui sont devenus *grisâtres*, décolorés, sont tous couchés dans le même sens. Ils ont perdu toute résistance ; avec les doigts on peut, d'un seul coup, en épiler plus d'une vingtaine.

Si l'on veut examiner ce que cette épilation, aux ongles, a enlevé, qu'on dépose cette pincée de cheveux sur une feuille de papier blanc ; ils demeureront tous parallèles, pris dans une lamelle épidermique, enlevée avec eux. Au dessous de cette lame épidermique qui indique le point d'émergence du cheveu hors de l'orifice pilaire, la racine ne fait qu'une saillie d'un millimètre ou d'un millimètre et demi, et cette courte portion radiculaire, qui ne correspond pas au tiers de la racine totale (cassée dans le follicule), possède un diamètre double de celui de la portion aérienne du même cheveu. De plus, ce fragment de racine est blanc crayeux, et la portion aérienne, blanc grisâtre.

β) *Lésion épidermique*. Quelquefois, mais très rarement, l'envahissement parasitaire de l'épiderme, entre les cheveux, se traduit par une lésion spéciale, autre que l'état squameux de sa surface. Cette lésion est alors tout à fait particulière. Son centre est un disque d'une couleur bistrée, cerclé d'un double liseré

1. Je crois, en effet, que le premier point atteint dans les cheveux est situé au niveau de l'orifice folliculaire. Ce serait la croissance du cheveu qui entraînerait *mécaniquement* la gaine parasitaire au-dessus du follicule. Voir à ce sujet la note de p. 93.

érythémateux. Son aspect est ainsi celui d'une cocarde : deux cercles rouges concentriques, séparés par un cercle pâle.

Cette lésion épidermique est fort rare : je ne suis pas sûr que l'évolution spontanée de la maladie la produise toujours; de plus il est rare d'observer exactement à ce moment une lésion *encore non traitée*. On sait combien la moindre application thérapeutique peut rendre laborieux le diagnostic d'une dermatose; on peut juger de ce que devient, après traitement et *épilation*, une plaque de tondante.

Cependant il arrive que l'épilation, au contraire, peut démontrer la lésion en cocarde, dont nous venons de parler. Sur un cuir chevelu *épilé*, les parties saines sont blanches, et les plaques teigneuses sont grises. Cette couleur grise est due aux racines que l'épilation a cassées sans les extraire, et qui demeurent un peu visibles par transparence dans l'épaisseur du cuir chevelu.

Or il arrive que le dessin formé dans le cuir chevelu par les racines cassées reproduit la cocarde aux deux lisérés concentriques que nous venons de décrire.

Les lésions, larges de 4 cent. seules, montrent cette forme, et les plaques arrêtées par le traitement avant qu'elles ne soient parvenues à ces dimensions ne les montrent pas.

Telle est la maladie à sa période d'état. Et là se bornent toutes ses lésions. Le *microsporum Audouini* est un parasite *du cheveu de l'enfant; il ne cause qu'une tondante*, et jamais on ne le voit, comme le trichophyton, causer chez l'adulte de lésion circinée de la peau glabre, ni de sycosis de la barbe, ni de lésions mycosiques unguéales[1].

1. Dans une épidémie de 120 cas où le parasite semblait par ses inoculations successives avoir augmenté de virulence, j'ai vu plusieurs fois de légères efflorescences épidermiques *sur la limite* du cuir chevelu. Ces efflorescences, simples exfoliations de la couche cornée, n'aboutissent jamais à la constitution du *cercle* trichophytique.

Une fois seulement sur 192 malades, j'ai observé sur la peau glabre d'un enfant ce même érythème en cocarde, à double liséré rouge, que j'ai décrit plus haut sur le cuir chevelu.

Cette lésion de forme objective toute spéciale a donné, à la culture, le *microsporum Audouini* en abondance. Inversement à ce cas unique, j'ajouterai que dans les très nombreux herpès circinés de la peau glabre de l'homme, c'est toujours un *trichophyton* (*megalosporon*) qui est le parasite causal. Et cette règle est si absolue que quand un enfant atteint de tondante présente au visage ces multiples points d'inoculation que mon maître, M. E. Besnier, a décrits sous le nom de « Trichophytie cutanée accessoire des teigneux », on peut être assuré, avant tout examen de la plaque de tondante, qu'il s'agit de la teigne *trichophytique* et non pas de la *teigne spéciale de Gruby*.

γ) *Évolution de la maladie.* A la longue, la plaque de *tondante rebelle* perd ses caractères objectifs initiaux. Et souvent, alors même que des plaques nouvelles prennent naissance à côté de la première, les cheveux malades de celle-ci disparaissent progressivement. Sur sa surface le cuir chevelu semble s'amincir et s'atrophier. Les cheveux malades sont remplacés par des follets grêles et rares qui deviennent progressivement plus nombreux et plus gros, et tendent à reprendre l'aspect des cheveux normaux. Mais cet état torpide peut durer pendant de longs mois, et pendant tout ce temps, à l'examen microscopique, on retrouve de-ci, de-là, quelques cheveux encore couverts de parasites, alors même que la plupart des cheveux d'abord malades ont retrouvé leur état normal.

Cette tondante, je le répète, est de beaucoup la plus grave des mycoses externes que l'enfant peut contracter. C'est d'abord la plus contagieuse. C'est la vraie tondante épidémique des écoles, celle qui peut faire trente, quarante, cinquante contagions en quelques semaines dans une division scolaire. Lorsqu'on porte assurément le diagnostic de cette affection chez un seul enfant d'une école, on peut d'avance affirmer qu'un certain nombre des enfants du même groupe en sont pareillement atteints. C'est dans les inspections de ces écoles contaminées qu'on peut alors surprendre la lésion à son tout premier début, à un moment où d'ordinaire le diagnostic n'est jamais fait.

Cette teigne est grave, non seulement par son extrême contagiosité, mais encore par sa durée extraordinaire. C'est la vraie tondante rebelle, celle qui peut persister pendant des années. On peut dire que sur un groupe d'enfants malades, le premier tiers se trouve guéri en huit ou dix mois, le second en douze à quinze mois environ. Les guérisons des derniers s'échelonneront ensuite à des intervalles de plus en plus éloignés...

Cependant c'est une maladie extrêmement bénigne, en ce sens qu'elle demeure exclusivement épidermique, qu'elle est absolument indolore, sans aucune importance au point de vue de la santé générale de l'enfant. Enfin elle se termine invariablement par la guérison complète. Il n'est pas un cheveu atteint qui ne finisse par repousser même spontanément, et par retrouver l'intégralité de ses caractères.

ε) *Diagnostic clinique.* Cette maladie ne pourrait être confondue

qu'avec les deux mycoses du cuir chevelu, désignées sous les noms de teigne *faveuse* et de teigne *trichophytique*.

Ces trois maladies n'ont réellement entre elles que peu de symptômes communs. Les nombreuses erreurs de diagnostic qu'elles font encore journellement commettre, les confusions auxquelles ces affections ont donné lieu, et les difficultés — historiques — qu'a rencontrées leur différenciation définitive, ne peuvent avoir qu'une explication. C'est que les principaux symptômes différentiels de chacune sont offerts par le cheveu.

Il est évident *a priori* qu'une différenciation qui repose sur la forme objective d'un organe d'un cinquième de millimètre de diamètre n'est pas visible pour tous les yeux. Peut-être n'est-il pas inutile d'ajouter ce principe général, que des maladies différentes peuvent avoir des symptômes communs, bien moins en raison de la similitude de leurs causes que par la simplicité des réactions morbides de l'organe qui est attaqué : le cheveu, qui est un organe simple, ne peut donner lieu à des aspects morbides diversifiés à l'infini pour notre œil nu.

Quoi qu'il en soit, si l'on veut récapituler brièvement les symptômes qu'offre le cheveu dans ces trois mycoses, on peut dire :

1° Que *dans le favus*, le cheveu est long, décoloré sur une assez grande hauteur au-dessus de l'orifice pilaire, entouré à sa base par un anneau gros ou petit, d'une couleur jaune soufre, d'une consistance plâtreuse, qui est le *godet favique*.

2° Que dans la *trichophytie vraie*, la trichophytie *à grosse spore*, le cheveu est cassé court, qu'il est gros, fortement coloré, non engainé à sa base, assez rare sur la plaque malade.

3° Que dans la *tondante spéciale de Gruby*, les cheveux parasités sont fins, grisâtres, abondants, très près l'un de l'autre, couchés dans le même sens. Et que de plus chacun d'eux est engainé, à sa base, d'une sorte de gaine grise qui semble une pellicule épidermique.

Ainsi doivent être distinguées, par le seul aspect du cheveu malade, les trois teignes que le médecin peut rencontrer.

J'ajouterai que si le *favus* s'observe à tout âge, car son évolution est chronique, progressive et indéfinie, la tondante *trichophytique* ne s'observe guère que de la seconde enfance à la puberté, et que la *mycose spéciale de Gruby*, contractée presque

exclusivement dans la première enfance, ne se rencontre que rarement au delà de huit ans, sauf comme reliquat d'une contagion antérieure.

II. — ÉTUDE MICROSCOPIQUE.

Les éléments du diagnostic différentiel ne sont très heureusement pas limités pour les teignes aux seuls symptômes objectifs; l'examen microscopique va nous révéler entre les trois parasites : *favus*, *trichophyton tonsurans* et *microsporum Audouini*, les différences morphologiques les plus tranchées.

A. J'établirai d'abord les caractères microscopiques spéciaux du *microsporum Audouini*.

Qu'on imagine une baguette enduite de colle et saupoudrée de sable fin, tel est l'aspect du cheveu atteint de ce parasite.

Ce qui, à l'œil nu, apparaît comme un étui blanchâtre autour du cheveu, n'est pas, comme il semblerait, un fourreau de cellules épidermiques, c'est un tissu ou un feutre, uniquement composé des éléments agglomérés du parasite.

C'est une mince gaine parasitaire adhérente au cheveu qui en est revêtu comme un arbre de son écorce.

Si l'on examine un cheveu malade, après l'avoir dégraissé dans l'éther et lavé à l'alcool, puis éclairci par une essence, sa surface paraîtra couverte en totalité d'une innombrable quantité de petites sporules rondes, toutes égales, toutes contiguës, dont la réunion ne dessine aucun filament régulier, mais qui sont au contraire irrégulièrement juxtaposées comme les cailloux d'une mosaïque. Et cette comparaison paraîtra plus juste quand on examinera le cheveu à un plus fort grossissement. Car alors chaque spore apparaîtra entourée d'un mince espace clair. Ainsi préparé, un cheveu montre des spores de 2 μ environ, à peine plus grosses qu'un staphylocoque.

Si l'on veut prendre une connaissance morphologique plus complète du parasite, on traitera le cheveu par une dissolution aqueuse de potasse à 40 0/0. On recouvrira la préparation ainsi faite d'une lamelle, et on chauffera presque jusqu'à ébullition. La préparation extemporanée ainsi obtenue donnera de très utiles renseignements :

1° Sur l'habitat et la disposition générale du parasite.

2° Sur la morphologie propre de chaque élément parasitaire.

3° Sur les rapports de ces éléments entre eux.

I *Habitat et disposition du parasite par rapport au cheveu.* — A un assez fort grossissement (Obj. 7, Ocul. 3, Leitz) on verra que la vis micrométrique peut établir dans le cheveu trois plans superposés.

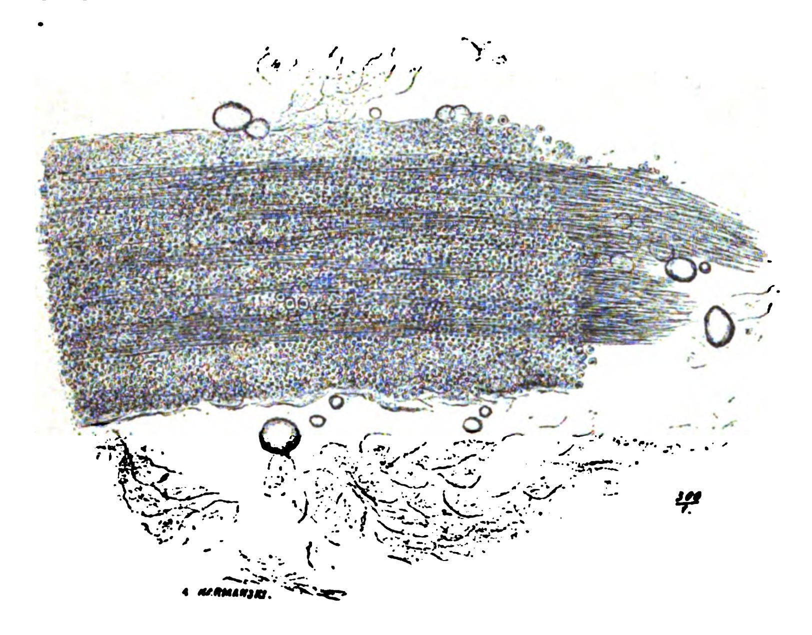


fig. 1. — Cheveu atteint de microsporum Audouini. Grosst. 300 diam.

Le premier (plan supérieur) est uniquement composé des sporules juxtaposées que nous connaissons. — Disposées sur une couche, elles ne forment pas d'amas superposés et elles ne laissent point non plus entre elles d'espace libre. Et cette juxtaposition ne montre *aucune série linéaire de spores, aucun filament mycélien sporulé*. C'est une couche *uniforme* de spores *égales*, disposées *sans ordre*.

Au premier abord, comme le cheveu situé au-dessous de cette couche de spores projette sur elle son ombre régulière, on pourrait croire les spores situées à la fois dans le cheveu et

autour de lui. C'est l'erreur que j'avais faite dans ma première description[1].

Mais en abaissant peu à peu la vis, on arrivera au deuxième plan (plan moyen), qui est au niveau du cheveu lui-même; et la substance même du cheveu apparaîtra alors complètement intacte, avec son pigment brunâtre, ses stries et plicatures longitudinales. Sa cuticule seulement et ses bords sont érodés. Alors la gaine parasitaire ne s'apercevra plus que sur les bords du cheveu et « par sa tranche ».

Enfin, si l'on abaisse encore l'objectif, on retrouvera (plan inférieur), derrière le cheveu, la même gaine que l'on observait au devant de lui. Mais ses détails seront moins précis parce que l'œil ne pourra la voir qu'au travers du cheveu interposé.

L'ensemble de ces constatations établit d'une façon certaine la disposition du parasite. Il forme une gaine continue autour du cheveu, *et il ne le pénètre pas dans sa substance.*

Tous les cheveux de la même tête présenteront le même tableau, la même spore et la même disposition.

Sans doute, suivant le degré d'action de la solution potassique, certains détails paraîtront plus ou moins nettement. Si le cheveu est trop peu éclairci et dissous, l'action de la potasse ayant été insuffisante, le détail morphologique du parasite apparaîtra moins précis. Si, au contraire, le cheveu a été dissocié, la gaine et le cheveu étant morcelés, l'habitat du parasite sera moins facile à reconnaître.

Mais avec un peu d'habitude de ces manipulations, on parvient à faire une préparation extemporanée parfaitement probante. Et l'aspect du cheveu parasité sera celui que je viens de dire.

Il reste un point important à établir dans la disposition générale du parasite autour du cheveu : c'est la direction de sa croissance. Se dirige-t-il indifféremment de bas en haut ou de haut en bas, ou sa croissance se produit-elle au contraire suivant une direction déterminée?

La question semble difficile à résoudre, puisque les éléments

1. Pour ceux qui pourraient douter de l'identité de notre ancien *trichophyton microsporon* et du *microsporon Audouini* de Gruby, il n'est pas inutile d'ajouter que je n'ai redressé cette erreur, que Gruby n'avait pas faite, qu'après la connaissance et la lecture du texte de cet auteur, comparé à l'examen de mes propres préparations.

du parasite, tous égaux et semblables, n'indiquent nullement par leur forme leur mode d'allongement et de propagation.

Cependant cette démonstration est facile. Il faut chercher sur les bords d'une plaque en activité un cheveu engainé dans sa partie aérienne, et que l'épilation cependant extirpera en totalité, avec son bulbe pilaire. Qu'on porte un tel cheveu sous le microscope, on verra que la gaine parasitaire est d'une épaisseur parfaitement égale dans toute la portion aérienne du cheveu, tandis que dans sa partie radiculaire elle s'amincit progressivement. A 1 ou 2 millimètres de l'orifice pilaire, cette gaine, jusque-là complète et sans interstices, ne montrera plus, sur la racine pilaire, que des îlots de spores, îlots séparés par de larges intervalles. Et plus bas, la racine tout à fait normale ne montrera plus aucune spore.

Ainsi, la croissance du *microsporum Audouini* s'effectue de haut en bas, de la portion aérienne du cheveu vers sa partie radiculaire, et la racine est la dernière partie intacte du cheveu[1].

Ce point de la physiologie du parasite est, comme nous le verrons, d'une importance capitale dans la différenciation de la mycose que j'étudie et des mycoses déjà connues et décrites : *favus* et *trichophytie*.

II. *La spore du microsporum Audouini.* — Examinons maintenant, non plus la disposition du parasite par rapport au cheveu, mais la morphologie propre de l'élément parasitaire.

J'ai dit que le cheveu, traité d'abord par l'alcool, ne montrait que de très fines spores de 2 μ, séparées les unes des autres par un très mince espace clair. Quand on traite, au contraire, le cheveu par la solution aqueuse de potasse, les éléments parasitaires, au même grossissement, semblent avoir augmenté de volume (3 μ), et, en particulier, l'espace intersporulaire semble plus large. Il est certain, en effet, que l'action du liquide a pour résultat de gonfler la cellule cryptogamique, et ce détail avait été parfaitement vu par Gruby.

1. Cependant, si l'on épile une région atteinte par le *microsporum Audouini*, les cheveux, quand ils repoussent sous un pansement protecteur (coton iodé et calotte de caoutchouc), reprennent leur gaîne parasitaire aérienne. C'est même là un moyen pratique de redonner à une lésion déjà traitée ses caractères originels. Dans un cas semblable, la gaine parasitaire, constituée dans le follicule pilaire, a forcément dû accompagner le cheveu dans sa croissance, et de bas en haut, mais ceci n'infirme en rien ce que nous venons de dire, quant à la direction propre de la croissance du parasite.

Si l'on a poussé un peu loin le chauffage du cheveu dans la solution potassique, en appuyant légèrement le doigt sur la lamelle couvre-objet, on dilacèrera le cheveu. Qu'on cherche ensuite dans une telle préparation, on trouvera presque sûrement un point où la gaine parasitaire se sera détachée du cheveu, et, comme un pan de manteau flottant, ne lui sera plus rattachée que par un bord. Le mince voile constitué par le parasite se trouvera ainsi en pleine lumière, et la morphologie de ses éléments deviendra parfaitement nette [1]. Alors on observera que chaque spore est constituée de deux parties, une masse ovalaire centrale un peu obscure, et une enveloppe hyaline assez épaisse, parfaitement claire et transparente, limitée par un bord à peine visible, sans double contour. Ces détails apparaîtront mieux encore si l'on a fait glisser sous la lamelle une goutte d'eau éosinée au $\frac{1}{500}$, parce que la spore végétale se colorera légèrement plus que le milieu ambiant.

Faut-il considérer la cellule ainsi constituée comme présentant un noyau central, entouré d'un protoplasma moins condensé, — cellule qui ne présenterait pas d'enveloppe? Ou, au contraire, faut-il considérer comme une enveloppe cette partie périphérique de la cellule, — enveloppe épaisse, transparente et hyaline, entourant le protoplasma cellulaire central?

Évidemment, c'est cette seconde opinion qu'il faut admettre, car le chauffage dans la solution potassique ne détruit pas cette partie périphérique, ce qui doit être, si cette enveloppe, au point de vue histochimique, est proche des celluloses, tandis qu'il devrait l'altérer si c'était un protoplasma sans enveloppe.

Quoi qu'il en soit, la cellule ainsi formée est régulière et ovale, la partie centrale et la partie périphérique ont des contours très exactement parallèles.

Ces cellules forment-elles la totalité du parasite? Ne présente-t-il pas une autre forme, une forme mycélienne, par exemple?

Quand on dissocie le cheveu, on trouve entre les spores désagrégées et flottantes, de minuscules tronçons de rameaux, n'ayant guère que 2 μ de large sur 6 à 10 μ de longueur et ordinairement sigmoïdes.

1. Cet examen doit être pratiqué avec un éclairage artificiel intense, — et un diaphragme extrêmement étroit. Obj. immersion 1/12.

De même, quand le cheveu a été, par un hasard de préparations, largement décortiqué de son enveloppe de spores, on voit à sa surface quelques tronçons de rameaux semblables. C'est évidemment cette forme qui a fait décrire à Gruby, dans le microsporum Audouini, outre les spores, ces rameaux qu'il appelle « branches ». Ils sont assez peu nombreux, peu apparents, réellement négligeables dans la totalité des éléments parasitaires, et c'est la gaine sporulaire qui constitue l'ensemble du parasite.

III. *Rapport des éléments parasitaires entre eux.* — Chacune des spores de la gaine, en raison de sa forme ronde ou ovale, donne à toutes les spores qui l'entourent un point de tangence presque égal. Il s'ensuit que, même en supposant que ces cellules naissent bout à bout, comme des cellules mycéliennes, — ce qui doit être, — leur forme rend leur série linéaire indistincte. Elles paraissent donc toutes juxtaposées comme le seraient des lentilles serrées en mince couche sur un papier, sans qu'on puisse distinguer, entre ces cellules, aucune agrégation en filaments.

Et en ce qui concerne l'épaisseur de la gaine qu'elles forment, quand on examine le cheveu, en mettant exactement au point l'axe même du cheveu, et qu'on observe alors la gaine parasitaire par la tranche, cette épaisseur semble de 15 ou 20 μ. C'est là encore une erreur d'optique.

Quand un fragment de cette gaine est détaché du cheveu, et renversé hors de lui, on peut observer qu'elle est constituée par une couche très mince de spores. Si elle semble épaisse quand on la regarde par la tranche, c'est qu'on en voit en réalité une coupe biaise, et il suffit, pour le prouver, d'observer que toutes ses parties ne sont pas au point en même temps.

B. *Examen microscopique différentiel.* — Telle est, dans son détail, la description du cheveu atteint de *microsporum Audouini*. Il est facile de dire en quoi ses caractères le différencient des parasites des autres mycoses externes, du *favus* et du *trichophyton*, car en réalité il ne présente avec eux aucun point commun.

Parlons d'abord du *trichophyton vrai* (*megalosporon*). Il est constitué par des cellules sporulées beaucoup plus grosses, *de* 5-6 μ *de diamètre*, toujours agminées en files régulières, *en filaments myceliens* toujours distincts. De plus, tous ces filaments sporulés,

dans l'immense majorité des tondantes trichophytiques, — dans toutes celles qui ne relèvent pas d'une origine animale [1], — tous ces filaments *sont contenus dans l'épaisseur même du cheveu.*

Enfin, les filaments *trichophytiques croissent dans la direction même du cheveu*, c'est-à-dire de bas en haut, comme le prouve la direction des bifurcations mycéliennes.

Ainsi donc, entre le *microsporum Audouini* et le *trichophyton* il n'y a que des différences, différences nombreuses et radicales:

1° Différence de dimension de la spore, l'une n'ayant que 2-3 μ, et l'autre 5-7 μ de diamètre;

2° Différence de situation ou d'habitat, puisque le *microsporum Audouini* est situé autour du cheveu, et le *trichophyton* dans le cheveu lui-même;

3° Différence d'agmination des spores, celles du *microsporum Audouini* paraissant distribuées l'une près de l'autre, sans agmination en files; celles du *trichophyton*, toujours placées bout à bout et constituant des filaments ou chapelets ;

4° Enfin il y a différence dans la direction même que suivent les deux parasites, le *microsporum* se dirigeant de la tige du cheveu vers sa racine, de haut en bas, et le *trichophyton* se développant dans la direction même du cheveu, de bas en haut.

En somme, les deux parasites diffèrent si totalement l'un de l'autre, dans leur ensemble et dans leur détail, que la confusion faite entre eux pendant si longtemps, et j'ajouterai, surtout après la différenciation si explicite de Gruby, demeure réellement invraisemblable [2].

Quant au *favus*, ses éléments sont des cellules mycéliennes sporulées ou non, rectangulaires, à parois hyalines presque invisibles (*achorion*), appréciables seulement par l'espace laissé libre entre les cellules.

1. La différence microscopique des *trichophytons* d'origine humaine et des *trichophytons* d'origine animale, c'est que les premiers sont situés en totalité dans l'épaisseur même du cheveu (*endothrix*), tandis que les trichophytons d'origine animale sont situés entre la racine du poil et sa gaine folliculaire (*ectothrix*). Les *trichophytons ectothrix* ne causent la tondante que dans 1/20 de la totalité des cas.

2. « Les cryptogames qui constituent la teigne tondante (*trichophyton megalosporon*) diffèrent tellement de ceux qui constituent la phyto-alopécie (*microsporum Audouini*), qu'il est impossible de confondre ces deux maladies. Leur siège même, leur développement et le rapport qu'ils offrent avec le tissu des cheveux diffèrent également... » (Gruby, *loc. citat.*)

Les filaments mycéliens constitués par ces cellules sont d'une grosseur très variable dans le même cheveu. Ils sont contenus dans le cheveu même et en suivent la direction ascendante, mais d'une façon irrégulière et capricieuse. Leur subdivision se fait par tri et tétratomie, formant en ces points des groupes de cellules polyédriques ressemblant assez au squelette du tarse chez l'homme, d'où leur nom de « tarses faviques ».

Ces mycéliums habitent aussi hors du cheveu, dans sa gaîne folliculaire. Ils se dirigent de bas en haut vers le corps muqueux de Malpighi. A son niveau, ils se multiplient à l'infini, divergent comme les branches d'un éventail, et c'est leur réunion qui forme la totalité du *godet* favique.

III. — Cultures.

La culture du *microsporum Audouini* est facile sur tous milieux usuels de laboratoire. Cependant certains de ces milieux sont préférables, soit au point de vue mycologique, parce qu'ils fournissent une culture de caractères particulièrement tranchés, soit au point de vue taxonomique, parce qu'ils permettent au végétal de développer plus complètement ses organes de reproduction.

α) *Technique*. — On pratique ces cultures de la façon suivante: Un cheveu malade est épilé et déposé sur une lame de verre flambée. Avec une aiguille coupante, on sépare, de la portion aérienne du cheveu, sa portion radiculaire qui est sectionnée à nouveau, en autant de tronçons que possible.

Chacune de ces parcelles est portée avec la baguette de platine, sur le milieu nutritif. Parmi les cultures pratiquées ainsi, et sans plus de précautions, la grande majorité sera pure d'emblée de toute association bactérienne et aussi de toute association cryptogamique.

β) *Culture spécifique sur pomme de terre*. — La culture la plus caractéristique que l'on puisse obtenir du *microsporum Audouini* est la culture en strie sur pomme de terre. En sept ou huit jours, la strie est devenue une traînée grise, puis d'un brun rougeâtre rappelant une traînée de sang qui aurait pénétré le milieu par imbibition, sans faire aucun relief à sa surface. Au bout de dix ou douze jours, sur cette strie commence à paraître un duvet rare et

court qui s'épaissit par places en petits bouquets. Sur ce milieu la végétation de ce cryptogame est pauvre.

Cependant j'insiste sur la grande valeur de ces cultures et voici pourquoi : c'est que, sur le même milieu, le *favus* produit une culture saillante et tourmentée, de surface contournée cérébriforme, d'une consistance rappelant celle de la pâte de carton, et le *trichophyton* (*mégalosporon*) une mince couche plate, poudreuse, d'un jaune brunâtre.

La différenciation des trois parasites, sur ce milieu nutritif, ne laisse donc rien à désirer ; les caractères objectifs constants de leur culture y suffisent. Mais, en outre, il y a, entre le *trichophyton* (*megalosporon*) et le *microsporum Audouini* sur ce milieu, une différence d'ordre physiologique d'une bien autre importance et sur laquelle il faut insister.

On sait que le *trichophyton* ne peut plus être considéré comme un parasite d'espèce unique, qu'il faut comprendre sous ce nom une véritable famille d'espèces très multiples. On serait donc tenté, malgré les nombreuses dissemblances déjà notées entre le *trichophyton* (*megalosporon*) et le *microsporum Audouini*, de les rattacher l'un à l'autre, d'en faire deux individus distincts d'une même famille.

Or, tous les trichophytons connus, quelle que soit leur espèce et leur groupe, l'origine de leur semence : cheveu, ongle, poil ou squame, ou encore que cette semence soit extraite d'une culture ; tous ces *trichophytons*, dis-je, donneront sur pomme de terre une culture qui mourra au bout de dix-huit jours, de vingt jours au maximum après son ensemencement. C'est là une règle absolue et qui ne souffre aucune exception [1].

Pendant ce temps, la culture du *microsporum Audouini* végétera lentement et faiblement, à la vérité, mais pendant un temps bien plus long.

Après deux, trois mois, la semence prise sera toujours vivante. Et ce fait est constant, comme le fait inverse de la mort des *trichophytons* en trois semaines sur le même milieu.

Il y a là, entre ces deux ordres de parasites, une différence d'autant plus saisissante, que, sur tous autres milieux, la vie active des *trichophytons* persiste pendant des mois. Sur pomme

1. Les cultures du *favus* sur ce milieu meurent en quatre semaines environ.

de terre, seulement, leur durée de vie est aussi brève, et sur ce milieu seulement aussi, leur mort arrive à une époque fixe et certaine d'avance.

γ) *Cultures sur moût de bière gélosé.* — Sur tous milieux d'ailleurs, les cultures du trichophyton (*megalosporon*) et du *microsporum Audouini* sont distinctes, mais les milieux peu azotés et fortement sucrés sont de beaucoup ceux qui montrent cette différenciation avec le plus d'évidence. Sous ce rapport, le milieu le plus simple et le plus usuel, qui se trouve un des meilleurs, est le *moût de bière.*

La semence du *microsporum Audouini*, déposée sur le moût de bière gélosé, au bout de trois ou quatre jours, pénètre dans le milieu et y forme une touffe de myséliums radiés, qui, vus par transparence, rappellent dans l'épaisseur du milieu l'aspect soyeux de la graine du peuplier. Quelques jours après, au centre de la colonie, émerge une touffe de rameaux aériens duveteux; et ce bouquet central demeurera permanent. Puis, après un temps, un premier cercle duveteux apparaîtra, laissant entre lui et le centre de la culture un cercle glabre. Puis un deuxième et un troisième cercle semblable se formeront. Lorsqu'on laisse les cultures vieillir, leurs cercles glabres intermédiaires deviennent un peu duveteux à leur tour. Enfin, après plusieurs mois, ce duvet toujours permanent perdra de sa blancheur absolue, deviendra d'un blanc moins pur [1]. Tels sont les caractères spéciaux, et je dirai : spécifiques, des cultures du *microsporum Audouini.*

IV. — Mycologie.

On sait que, de tous les champignons parasitaires de l'homme, aucun ne parvient — dans sa lésion — à un stade de sporulation externe, et que toutes les spores du *favus*, du *trichophyton*, et j'ajouterai : du *microsporum Audouini*, que l'on trouve dans le cheveu, le poil, l'ongle ou la squame, sont des *spores* internes ou *myséliennes*. Aucun indice ne peut donc être fourni, quant à la place botanique de ces végétaux, par la forme du parasite dans la lésion.

1. Sur le même milieu, le *trichophyton megalosporon*, dans le même temps, aura fourni une culture aride, poudreuse, jaune, dont le centre est saillant en mamelon et la périphérie marquée par des sillons arborescents, couverts de la même poudre jaune.

Pour déterminer cette inconnue, il faut provoquer en culture le développement mycélien « normal » de ces êtres, et s'il est possible, leur sporulation externe. C'est ainsi, par exemple, que M. Duclaux a pu fixer le mode de sporulation externe du *trichophyton* qui est *la grappe*, et assigner à ce parasite sa place à côté des Bothrytis parasitaires déjà connus.

C'est une semblable recherche qu'il faut tenter pour le *microsporum Audouini*.

α) *Développement de la culture. Mycélium.* — Dans la culture

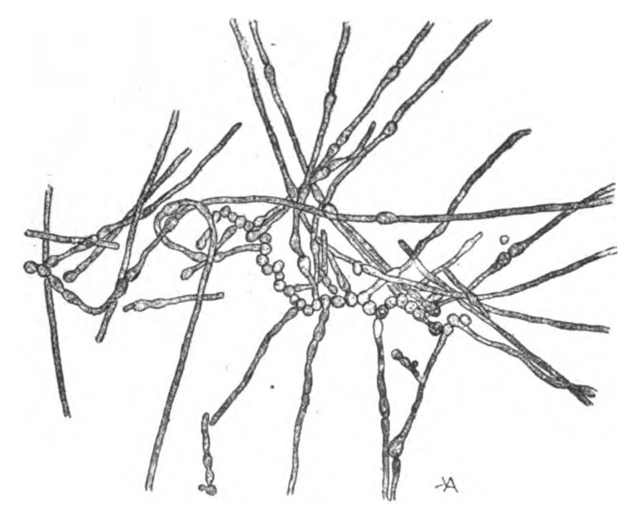


Fig. 2.

en goutte suspendue, la spore-mère pousse d'abord une série d'articles courts, fort semblables à elle-même, puis c'est de cette série de cellules rondes ou ovoïdes que partent les rameaux mycéliens vrais.

Dès les premiers jours, on peut apercevoir les différences majeures entre le port et la forme du mycélium trichophytique et de celui du *microsporum Audouini*.

D'abord le *trichophyton* donne lieu à des rameaux mycéliens extrêmement touffus, abondants et comme feutrés ; le *microsporum Audouini*, au contraire, à des filaments espacés qui ne forment jamais à l'œil un obstacle impénétrable.

En second lieu, les filaments mycéliens du *trichophyton* sont réguliers, d'un diamètre sensiblement égal (environ 3-4 μ). —

Les cellules mycéliennes du *microsporum Audouini* sont au contraire toutes renflées en massue à une de leurs extrémités, en sorte que le mycélium de la culture apparaît comme moniliforme (fig. 2).

On objectera, je sais, qu'on ne peut attribuer au mycélium une grande valeur dans une différenciation d'espèces en mycologie. Cependant, une particularité aussi spéciale et aussi constante que celle de ces renflements myceliens réguliers mérite bien d'être signalée.

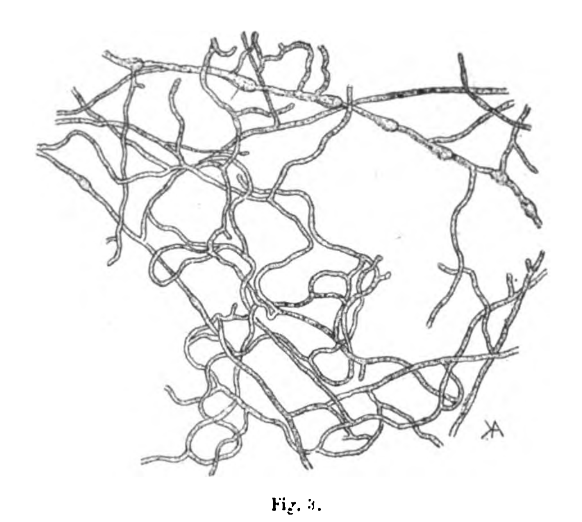


Fig. 3.

Peu à peu, à mesure que la culture du *microsporum Audouini* devient adulte, les renflements mycéliens augmentent de diamètre et prennent plus d'importance dans le port d'ensemble du végétal; ces renflements atteignent alors 9-12 μ de diamètre et quelquefois davantage.

La culture demeure ainsi pendant plusieurs jours. Puis, vers le dixième jour environ, à sa périphérie, les terminaisons mycéliennes cessent d'être moniliformes; elles émettent de longs filaments terminaux, contournés en tous sens comme des lanières de fouet (fig. 3) qui peuvent s'entrecroiser de toutes façons, mais en laissant toujours beaucoup d'espace entre elles.

Arrivé à ce point qui annonce la sporulation prochaine, le développement de la culture s'arrête souvent tout à fait. Mais dans les milieux fortement azotés et sucrés (maltose 3,5 0/0, pep-

tone 1 0/0), le développement de la culture continue, et voici comment s'opère la sporulation externe. En un point des filaments contournés terminaux, point le plus souvent incurvé en crosse, un épaississement latéral se produit sur une longueur de 15 à 18 μ environ. Puis il se développe, d'un seul côté de la branche fructifère, une série d'excroissances, tantôt obtuses, et l'hyphe sporifère prend alors la forme d'une lame de scie, tantôt au contraire assez effilées et ressemblant exactement aux dents d'un peigne. Sur ces pédicules prennent naissances les spores externes, chaque denticule ne supporte qu'une seule spore.

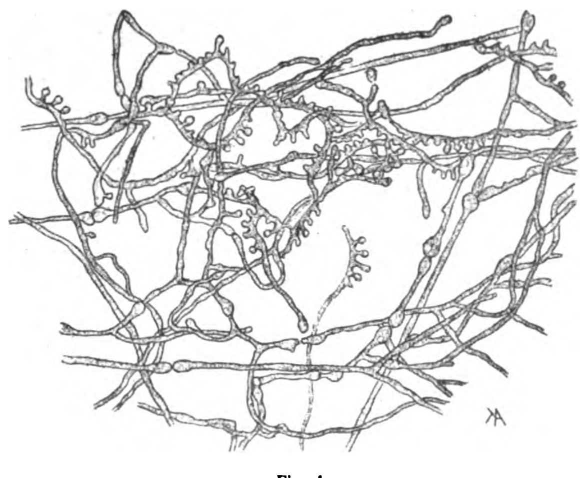


Fig. 4.

J'ajouterai que ces spores sont très sessiles et que la plupart des hyphes sporifères n'en ont plus, une fois la préparation montée. Cependant, avec quelque soin, on peut encore assez facilement en retrouver quelques-unes encore en place (fig. 4).

Tel est le mode de sporulation externe du *microsporum Audouini*. On voit à quel point cet appareil de forme *pectinée* s'éloigne de la *grappe* sporifère des *trichophytons* et des *bothrytis*.

Je n'insisterai point sur la taxonomie proprement dite du *microsporum Audouini*; elle sera mieux déterminée par les mycologues que par moi.

D'ailleurs, je n'ai trouvé sur ce champignon, en culture, aucune ébauche de fruit supérieur pouvant donner un indice sur sa classification définitive. Je m'en tiendrai donc sur ce point à

la description que je viens de faire. Le seul but de cette étude est de différencier d'une façon définitive le *trichophyton* et le *microsporum Audouini*, et je crois que sur ce point la clinique, l'examen microscopique, la culture, la physiologie de ces deux parasites sont en parfait accord.

V. — Inoculations.

Je ne parlerai des inoculations animales que pour mémoire, car elles sont restées négatives. Sur le tégument glabre de l'homme, les inoculations donnent lieu cependant à une légère rougeur non circinée, accompagnée d'une légère exfoliation épidermique. Ce sont là des lésions en tout semblables aux efflorescences épidermiques qui accompagnent très rarement, comme nous l'avons vu, l'évolution de cette tondante.

Dans cette lésion, après quatre jours, on retrouve des éléments mycéliens jeunes, néo-formés, puis la lésion, abortive, disparaît spontanément.

La culture de retour, extraite de la lésion inoculée, n'est possible que pendant quatre ou cinq jours au plus. Encore s'en faut-il beaucoup que ces cultures soient uniformément positives. Une telle lésion est trop peu spéciale, et le laps de temps entre l'inoculation et la culture de retour trop restreint, pour qu'on puisse interpréter ces résultats comme des inoculations sûrement positives.

Mais, si l'on considère la localisation exclusive de la maladie au cuir chevelu, et si l'on remarque entre quelles étroites limites d'âge cette maladie est comme parquée chez l'enfant, on ne saurait pas non plus se faire une arme des résultats négatifs de l'inoculation expérimentale, pour soutenir que le parasite causal de la maladie n'est pas celui que nous décrivons.

Le total de nos observations de *microsporum Audouini* se monte à 192. Invariablement le même aspect du cheveu a correspondu à la même culture, et cette culture est obtenue d'emblée, pour ainsi dire sans un manque... Inversement, sur l'aspect de la culture, je puis affirmer (et je l'ai fait maintes fois sur des cultures provenant d'autres laboratoires que le mien) l'aspect du cheveu qui leur avait donné naissance. Dans ces conditions, je crois qu'il est difficile de mettre en doute le rôle parasitaire actif du champignon cultivé.

Malheureusement, la contagiosité extrême de l'affection, et sa longue durée, interdisent formellement au médecin toute inoculation expérimentale du *microsporum* sur le cuir chevelu de l'enfant, qui paraît son terrain nécessaire de germination.

J'espère cependant que cette difficulté pourra prochainement être tournée : L'homme n'est pas le seul hôte des cryptogames de cette famille. L'« herpès contagieux vulgaire » des poulains est fourni par une espèce parasitaire au moins très voisine de celle que nous venons de décrire, et dont les organes de sporulation externe sont identiques.

Le cheval adulte,— qui peut, ainsi que je l'ai prouvé, abriter au moins deux espèces de trichophyton (megalosporon) et qui est très souvent pour l'homme adulte un agent de transmission de ces deux trichophyties spéciales, — peut, dans ses deux premières années, contracter aussi un *microsporum Audouini*, aussi différent de ses *trichophytons* propres que le *microsporum Audouini* de l'enfant est différent des *trichophytons* de l'enfant.

L'espèce *équine* de *microsporum* diffère par quelques caractères secondaires du *microsporum* de l'enfant; cependant sa culture en strie rougeâtre sur pomme de terre (caractère spécifique) est rigoureusement identique à celle de l'homme. Or l'inoculation de cette espèce est très facilement positive sur le cheval. Peut-être sera-t-il possible de transmettre aussi au cheval l'espèce d'origine humaine, et de donner ainsi la preuve de son rôle parasitaire actif, preuve que l'on n'est pas en droit de chercher à fournir par l'inoculation directe de l'enfant.

VI. — Traitement.

Je ne voudrais pas terminer cette étude du *microsporum Audouini* sans indiquer en quelques mots ce que peut la thérapeutique dans la guérison de la maladie qu'il provoque.

Et ce chapitre peut résumer non seulement la thérapeutique de la teigne spéciale dont je viens de parler, mais d'une façon plus générale celle de toutes les teignes, et tout spécialement celle des deux tondantes, *tondante trichophytique* et *tondante spéciale de Gruby*.

Trois facteurs dominent la recherche d'un spécifique dans toute affection parasitaire externe. Il faut un agent thérapeutique

innocent pour le malade, toxique pour le microbe, enfin il faut que le spécifique soit *mis en contact avec le parasite* qu'il doit détruire.

Dans aucune maladie, plus que dans les mycoses externes, dans les teignes, ce facteur spécial de l'*accessibilité du parasiticide au microbe* n'est mis en évidence avec une plus grande clarté.

Ici, en effet, le parasite est tantôt superficiel et alors facile à tuer, tantôt profond et alors intangible, et les tondantes comme le favus montrent, avec une précision extrême, les limites actuelles de l'antisepsie externe.

Que voyons-nous en effet? Tantôt le parasite pullule dans les couches épidermiques, qu'il est loisible au médecin d'exfolier, sans nuire au malade, car d'elles-mêmes elles se régénèrent intégralement. Ici le parasite est à notre portée comme dans une culture; aussi l'application médicamenteuse est-elle toujours suivie d'un plein succès.

Mais, que le parasite descende le long d'un cheveu jusqu'à sa racine; trois ou quatre millimètres le sépareront à peine du médicament; la maladie restera livrée à elle-même et ne guérira plus que spontanément.

Voilà le résumé succinct et tout à fait exact de ce que peut la thérapeutique dans la guérison des tondantes.

Le parasite, comme tous les champignons, n'offre par lui-même qu'une résistance infime aux agents toxiques. Tout est poison pour lui; l'aldéhyde formique au quarante-millième à l'état de vapeur le tue dans les cultures (Pottevin); une température de 53° en milieu humide tue même sa spore. Et cependant, parce que quelques millimètres de peau saine le séparent de ces agents, on ne pourra rien contre lui.

Évidemment, on pourrait user de moyens violents. Une escharification profonde des tissus allant jusqu'à la racine des cheveux ou des poils, aurait bien raison du parasite, mais le cheveu serait détruit. On aurait provoqué la formation d'une cicatrice alopécique définitive. Or ce moyen serait rationnel, s'il s'agissait d'une mycose grave, pouvant indéfiniment gagner en profondeur, causer d'irrémédiables désordres. Là, ce n'est point le cas, puisque la tondante se guérit seule, après un temps plus ou moins long.

Donc, toute intervention armée du médecin est contre-indi-

quée par la marche spontanée de la maladie elle-même, jusqu'à ce qu'on ait trouvé un médicament, lotion, pommade ou autre qui agisse sur le parasite sans léser définitivement le cheveu.

Ni les corps gras, miscibles au sébum des glandes du cheveu, ni les éthers qui le dissolvent, ne peuvent porter *jusqu'à la racine* du cheveu, même à l'état de vapeur, un médicament quelconque. C'est ce que prouve du moins l'expérience.

L'anatomie du follicule pilaire, du reste, donne clairement les raisons de ce résultat. Sur une coupe du cuir chevelu, on voit la racine pilaire, située dans un infundibulum dermique et épidermique, descendre bien au-dessous du *derme* avoisinant, en plein tissu hypodermique, à *quatre* et même *cinq millimètres* de profondeur. Ces infundibula ne communiquent avec l'extérieur que par un pertuis de 1/5 de millimètre de diamètre, exactement comblé par le cheveu lui-même, et par les cellules du revêtement épidermique tassées contre lui. Il s'ensuit que l'infundibulum est une étroite et profonde cavité hermétiquement close. Et l'expérimentation vérifie l'occlusion rigoureuse de cette cavité virtuelle, car la racine d'un cheveu normal est toujours et rigoureusement stérile.

Il resterait, semble-t-il, une dernière chance de succès dans l'*épilation*.

Et en effet, si, comme dans le favus, le cheveu venait entier à l'épilation (je parle en général, car il y a des favus à cheveux cassants), on pourrait espérer amener le parasite au dehors, puisqu'on ne peut aller jusqu'à lui. Cette espérance, dans les tondantes, est illusoire : à l'épilation, le cheveu casse dans le follicule pilaire, et comme cette fracture se produit précisément au point le moins résistant, le plus malade du cheveu, on ne peut espérer épiler, même la majeure partie du parasite.

Ainsi, cette sorte de *stérilisation discontinue*, que des épilations répétées peuvent pratiquer sur un cuir chevelu favique, est impossible dans les tondantes.

Lorsque les caractères cliniques généraux de ces maladies ont été suffisamment établis pour qu'on pût à coup sûr les reconnaître, on a cru dans certains cas avoir guéri rapidement des tondantes par des médicaments divers. Aujourd'hui, on sait que spontanément certaines tondantes sont bénignes comme d'autres sont graves. On ne peut donc aucunement

s'appuyer sur ces prétendus succès pour vanter un procédé quelconque de traitement. Sans doute, les cheveux étant tondus ras, une bordure d'épilation cerclant les plaques malades et les isolant au milieu du cuir chevelu, enfin des applications antiseptiques superficielles répétées, enrayeront les progrès de la maladie; les plaques cesseront de s'étendre: on aura fait la part du feu. Mais nous ne savons à l'heure actuelle aucun traitement qui, en s'adressant à une plaque de tondante prise toute seule, en gardant les autres plaques non traitées comme témoins, puisse guérir cette plaque avant les autres.

Dans ces conditions, je crois qu'il est permis de conclure, en toute franchise, que la médecine est tout à fait hors d'état de guérir les teignes tondantes.

Une autre conclusion s'impose concernant les essais ultérieurs de thérapeutique. C'est qu'il faut dorénavant chercher beaucoup moins l'agent le plus toxique pour les cultures *in vitro*, que l'agent, même doué d'une toxicité moindre, mais d'un pouvoir de pénétration considérable, et, dans cet ordre d'idées, on peut penser que l'action directe des agents antiseptiques *gazeux* est le moyen thérapeutique qui offre dans l'avenir le plus de chance de succès.

G. — CONCLUSIONS.

I. — Sous le nom commun de *teigne tondante trichophytique* on a confondu, jusqu'à ce jour, deux maladies complètement et absolument distinctes, d'une fréquence à peu près égale, et qui n'ont de commun que de s'attaquer l'une et l'autre au cheveu.

II. — L'une de ces tondantes est effectivement causée par les mêmes parasites cryptogamiques qui créent les trichophyties d'autres sièges. Elle mérite donc de conserver son nom de tondante *trichophytique*.

III. — L'autre, que j'appelle *tondante spéciale de Gruby*, du nom de celui qui décrivit pour la première fois son parasite, est causée par le *microsporum Audouini* (Gruby), ET CE PARASITE N'EST PAS UN TRICHOPHYTON.

SUR LES VINS MANNITÉS

Par MM. U. GAYON et E. DUBOURG

Depuis quelques années, on a constaté la présence anormale de la mannite dans certains vins d'Algérie, d'Espagne, d'Italie et même de France. Plusieurs chimistes ont étudié cette nouvelle maladie et cherché, soit à la caractériser, soit à en déterminer les causes. Ce sont principalement : en France, MM. Carles[1], Roos[2], Portes[3] et Blarez[4]; en Algérie, MM. Dandrieu[5], Dugast[6], Jégou[7], Malbot[8] et Sébastien[9]. Les difficultés créées au commerce et à la propriété par les vins mannités expliquent les nombreux travaux déjà publiés sur ce sujet.

Il est facile de faire l'essai qualitatif et quantitatif de la mannite dans un liquide fermenté : pour l'essai qualitatif, il suffit de faire évaporer lentement à froid 2 ou 3 centimètres cubes du liquide dans un verre de montre; au bout de vingt-quatre heures, la mannite, s'il y en a, se présente sous la forme d'aiguilles cristallines très fines, d'un éclat soyeux, rayonnant autour de différents centres, parfaitement distinctes des cristaux de tartrates de potasse ou de chaux. On peut, par ce procédé, en déceler des quantités très faibles, moins de 1 gramme par litre.

Pour la doser, on concentre au bain-marie 50 c. c. de liquide jusqu'à consistance fluide ; on laisse cristalliser l'extrait pendant deux ou trois jours dans un endroit frais; puis, on mélange le

1. C. R., tome CXII, page 811. — *Journal de Pharmacie et de Chimie*, juin 1891.
2. *Mémoires de la Société des sciences physiques et naturelles de Bordeaux*. Séance du 28 juillet 1892, (4), tome III. — *Journal de Ph. et de Ch*, tome XXVII, page 405; 1893.
3. *Journal de Ph. et de Ch.*, t. XXVI, page 383; 1892.
4. — — t. XXVII pages 150 et 260; 1893.
5. *L'Algérie Agricole*, page 340; 1893.
6. — pages 696 et 732.
7. — page 675. — *Journal de Ph. et de Ch.*, tome XXVIII, page 103; 1893.
8. — pages 676 et 717.
9. — page 725.

résidu avec 2 grammes de sable fin calciné. On broie ensuite la masse avec un pilon d'agate en délayant peu à peu avec 100 c. c. d'alcool à 85° saturé de mannite à la même température ; on filtre et on laisse égoutter au moins deux heures.

On introduit le filtre et tout son contenu dans un appareil à digestion chaude, et l'on traite par 100 c. c. d'alcool à 85° pendant une heure. Après refroidissement, on distille les 4/5 de l'alcool, on ajoute un peu de noir au liquide restant et on filtre ; on lave le noir deux fois avec 50 c. c. environ d'alcool à 85° bouillant, et on évapore à 60°. Le résidu est de la mannite pure.

La méthode précédente a été contrôlée par de nombreux essais synthétiques, et a toujours donné avec exactitude les poids de mannite ajoutés, à la condition de faire fermenter préalablement le sucre qui pouvait exister dans les liqueurs primitives.

Les doses de mannite ainsi trouvée dans les vins sont extrêmement variables ; de moins d'un gramme, le poids peut s'élever à 25 et 30 grammes par litre. Les vins blancs sont beaucoup plus rarement mannités que les vins rouges ; toutefois nous en avons rencontré un cas que nous plaçons dans le tableau suivant, à côté de quelques exemples d'analyses de vins rouges ;

	Nº 1 Vin rouge français (1892).	Nº 2 Vin rouge français (1892).	Nº 3 Vin blanc algérien (1891).	Nº 4 Vin rouge algérien (1892).	Nº 5 Vin rouge espagnol (1892).
Alcool..............	10°, 3	11°, 4	11°	12°, 4	9°, 3
Extrait sec, par litre.	32gr,50	39gr,25	71gr,00	70gr,90	118gr,00
Sucre réducteur —	6, 70	8, 66	18, 00	21, 84	60, 24
Crême de tartre —	2, 10	1, 50	3, 50	1, 70	1, 95
Acidité totale —	4, 90	6, 10	9, 58	8, 60	8, 27
Acidité volatile —	1, 62	2, 20	5, 40	4, 28	5, 38
Mannite —	8, 60	12, 36	31, 46	18, 32	23, 50
Rotation saccharimétrique............	»	— 3, 0	+ 3, 3	— 0, 4	— 23, 0

Quelques-uns de ces vins ont été placés en bouteilles dans une pièce froide, et, au bout de plusieurs mois, soumis à une nouvelle analyse, laquelle a démontré que le sucre restant avait continué à se transformer en mannite.

Les variations dans les proportions de sucre et de mannite ont été, pour les vins nos 1, 2 et 4 :

	Vin n° 1.	Vin n° 2.	Vin n° 4.
Durée de l'expérience.....	8 mois.	8 mois.	9 mois.
Perte de sucre, par litre..	5gr, 60	4gr, 73	16gr, 05
Gain de mannite, par litre.	2, 00	1, 62	13, 32

Des échantillons, chauffés à 60° pour servir de témoins, avaient conservé leur composition primitive, ce qui démontre la possibilité d'enrayer le progrès de cette maladie, comme des autres, par la pasteurisation.

On remarquera que les vins mannités renferment généralement un excès de sucre et un excès d'acidité totale, due surtout aux acides volatils; aussi ont-ils une saveur aigre-douce qui est souvent caractéristique de la présence de la mannite.

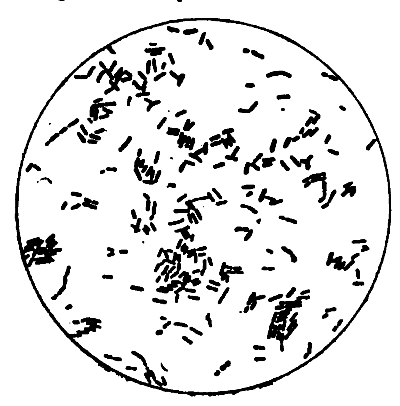


Fig. 1. Gross. 600.

L'extrait sec est très élevé. La rotation saccharimétrique, ordinairement gauche, peut cependant devenir droite, comme dans le vin blanc algérien; la crème de tartre ne paraît pas atteinte, quel que soit le degré de l'altération mannitique.

Tous ces faits vont recevoir leur explication par l'étude d'un ferment mannitique que nous avons isolé et cultivé dans divers milieux naturels ou artificiels.

Ce ferment a été retiré du vin blanc d'Algérie analysé plus haut. A l'état de pureté, il se présente (fig. 1) sous la forme de petits bâtonnets très-courts, immobiles, qui, au lieu de rester indépendants et disséminés dans le liquide, se groupent en grand nombre et forment des amas assez difficiles à désagréger.

Il se développe bien dans un moût de raisin ou dans du vin doux, mais mieux dans des solutions de sucre interverti addi-

tionnées de 20 à 30 grammes environ d'extrait Liebig par litre. Dans tous les cas, le liquide reste limpide ; il ne se dégage aucune trace de gaz ; le ferment tombe au fond des vases où il forme une couche légère, continue, d'un aspect blanchâtre. Dans du bouillon de Liebig seul, non sucré, le ferment reste sans développement et sans effet. Il vit indifféremment en surface ou en épaisseur, en présence ou en l'absence de l'air.

La transformation du sucre réducteur en mannite est assez rapide au début de la culture ; elle se ralentit plus tard et atteint une limite qui, dans nos expériences, a varié entre 25 et 50 grammes de mannite par litre. Cette limite dépend de la richesse du milieu en éléments nutritifs, de la quantité initiale de sucre et d'acide, de la température, etc. La proportion des acides formés suit une marche sensiblement parallèle à celle de la mannite.

Le tableau suivant présente, comme exemple, les phases successives d'une fermentation accomplie à la température de 35°, dans du bouillon Liebig renfermant 25 grammes de matières nutritives, 103gr,10 de sucre interverti et 1gr,58 d'acidité initiale par litre.

			En 9 jours.	En 20 jours.	En 30 jours.
Sucre disparu		par litre.	27gr,28	38gr,37	42gr,86
Mannite formée		—	21, 46	29, 99	31, 46
Acides formés, en SO^4H^2	fixes	—	1, 98	3, 36	3, 52
	volatils	—	3, 06	4, 33	4, 73
	totaux	—	5, 04	7, 69	8, 25

Pendant la durée de l'expérience, la rotation, exprimée en divisions saccharimétriques, est passée de — 18,8 à + 6,6, ce qui indique que, des deux sucres constituant le sucre interverti, le lévulose est plus apte que le glucose à s'hydrogéner pour former de la mannite.

Si la proportion initiale de sucre réducteur est trop forte, la fermentation s'arrête en général avant que le liquide ne soit devenu dextrogyre ; mais, dans ce cas, la rotation gauche diminue considérablement. C'est ce qui arrive avec le moût naturel de raisin, qui donne d'ailleurs les mêmes produits que le bouillon Liebig sucré.

Ainsi, avec un moût renfermant 186gr,92 de sucre et 3gr,79 d'acide par litre, on a obtenu :

			En 34 jours.	En 48 jours.
			—	—
Sucre disparu,		par litre.	28gr,12	37gr,66
Mannite formée		—	19, 20	29, 58
Acides formés, en SO^4H^2	fixes	—	1, 40	2, 61
	volatils	—	3, 89	4, 10
	totaux	—	5, 29	6, 71

Pendant la durée de l'expérience, la rotation est passée de — 38.6 à — 19.0 divisions saccharimétriques.

Dans les exemples qui précèdent, comme dans tous les cas analogues, la totalité des matières sucrées n'a pas été hydrogénée, sans doute parce que l'excès de sucre restant et surtout l'excès d'acides formés ont gêné le développement du ferment mannitique.

Cette action nuisible de l'acidité ressort nettement de l'expérience suivante, où des fioles de bouillon Liebig sucré ont reçu, avec la même semence, des doses croissantes d'acide tartrique; les acidités sont exprimées en acide sulfurique par litre.

	Acidité initiale.	Accroissement d'acidité. Totale.	Accroissement d'acidité. Volatile.	Sucre disparu par litre.
	—	—	—	—
1	2gr,00	5gr,71	3gr,10	31gr,06
2	2, 78	5, 01	3, 50	24, 08
3	3, 12	5, 01	3, 52	20, 39
4	4, 00	4, 17	2, 58	13, 80
5	4, 88	2, 04	1, 19	»
6	5, 34	0, 63	0, 46	1, 77
7	6, 74	0, 34	0, 31	Traces.

La quantité de sucre disparu est exactement en raison inverse de l'acidité primitive du milieu de culture.

En diminuant la proportion de sucre, ou mieux encore en substituant du lévulose au sucre interverti, la fermentation mannitique est à la fois plus rapide et plus complète. Ainsi, avec une solution d'inuline saccharifiée, on a obtenu par litre :

	En 7 jours.	En 19 jours.
	—	—
Lévulose disparu........	37gr,35	49gr,50
Mannite formée.........	26, 62	35, 66
Acidité totale, en SO^4H^2.	6, 54	8, 83

Tout le lévulose avait fermenté. Nous étudierons plus tard l'action du ferment mannitique sur le glucose et sur les autres sucres.

Comme on l'a vu, la production d'acides fixes et d'acides

volatils est inséparable de la formation de la mannite; pris ensemble, leur poids représente, en acide sulfurique monohydraté, plus d'un cinquième du poids de sucre fermenté.

Les acides fixes sont presque exclusivement constitués par de l'acide lactique, qu'il est facile de mettre en évidence en épuisant à chaud le résidu sec d'une fermentation par de l'éther pur. Après évaporation, l'éther laisse un liquide sirupeux, incristallisable, très acide, et donnant avec l'oxyde de zinc un sel soluble cristallisable sous la forme caractéristique du lactate de zinc. L'acide lactique a été trouvé récemment par M. Blarez dans des vins mannités.

Quant aux acides volatils, ils sont formés par de l'acide acétique. La méthode de M. Duclaux a donné en effet, pour les prises successives à la distillation fractionnée, les mêmes chiffres que l'acide acétique pur, que le liquide fermenté fût du moût de raisins ou du bouillon Liebig sucré.

Comme cette constatation a une certaine importance pour la différenciation du ferment mannitique et du microbe de la tourne, nous rapprocherons, comme exemple, les nombres relatifs à l'un de nos essais de ceux que M. Duclaux donne pour l'acide acétique pur.

		Valeurs des rapports B.		
		Fermentation mannitique.	Acide acétique pur.	Différences.
		—	—	—
1	—	6,1	5,9	+ 0,2
2	—	12,4	12,2	+ 0,2
3	—	18,9	18,7	+ 0,2
4	—	25,8	25,6	+ 0,2
5	—	33,0	33,9	+ 0,1
6	—	40,7	40,6	+ 0,1
7	—	48,9	48,9	0,0
8	—	58,0	57,9	+ 0,1
9	—	67,9	67,9	0,0
10	—	79,9	79,8	+ 0,1

La présence des acides lactique et acétique n'a pas lieu de surprendre, car d'une part ils résultent d'un simple dédoublement de la molécule du sucre, et d'autre part, on sait qu'ils prennent naissance dans une foule de circonstances, sous l'influence d'un grand nombre de microbes.

Si maintenant, dans les résultats, on exprime les acides formés, fixes et volatils, non plus en acide sulfurique, mais bien,

respectivement, en acide lactique et en acide acétique, on aura, avec la mannite, les éléments d'une valeur approchée de l'équation de la fermentation mannitique. Ce calcul, appliqué à la fermentation du lévulose citée plus haut, donne :

Mannite............	$35^{gr},66$	soit en centièmes	72,0
Acide lactique.......	5, 01		10,1
— acétique......	7, 47		15,1
Matières non dosées.	1, 36		2,8
Lévulose disparue...	49, 50		100,0

C'est dans les matières non dosées qu'il faudrait vraisemblablement chercher le complément de l'hydrogène qui s'est fixé sur les trois quarts du sucre et l'a transformé en mannite.

Les faits qui précèdent confirment, en les précisant, les essais de culture exécutés à Cette par M. Roos avec l'ensemble des dépôts organisés d'un vin mannité ; ils prouvent que la présence de la mannite est bien due à une fermentation vicieuse, et que les vins malades ne sont pas nécessairement des vins sophistiqués.

Lorsque la vendange est jetée dans la cuve, les ferments mannitiques se développent si la température du moût s'élève suffisamment ; ils exercent alors leur action propre sur une partie du sucre, et leurs effets s'ajoutent à ceux de la levure alcoolique. Le vin sort donc de la cuve déjà souillé de mannite et d'acides anormaux ; s'il contient encore du sucre, le mal ne peut que s'aggraver par la suite.

Les conditions qui favorisent cette fermentation mannitique du moût de raisin se rencontrent naturellement dans les pays chauds ; aussi est-ce dans les vins d'Algérie, d'Espagne et d'Italie qu'on a signalé tout d'abord l'altération dont il s'agit. Il a fallu les températures exceptionnelles des étés de 1892 et de 1893 pour que la mannite apparût également en quantité sensible dans les vins de France.

On peut réaliser par l'expérience la transformation simultanée du sucre réducteur en mannite et en alcool. Ainsi, en ensemençant en même temps du ferment mannitique et du *S. pastorianus* pur, dans du bouillon Liebig contenant $113^{gr},62$ de sucre et $2^{gr},73$ d'acidité par litre, nous avons obtenu en quelques jours, à la température de 35°, un liquide fermenté ne renfermant plus de sucre et composé comme suit :

Alcool pur	6°,4
Mannite............	5gr,12 par litre.
Acidité volatile.....	1,96 —
Acides fixes	4,04 —
Acidité totale.......	6,00 —

La fermentation alcoolique ne paraît donc pas gêner sensiblement la fermentation mannitique, si du moins la proportion d'alcool est peu élevée. Il n'en est pas de même si la proportion d'alcool est plus considérable. En ensemençant, en effet, le même ferment dans des fioles de bouillon Liebig contenant des doses croissantes d'alcool, nous avons obtenu les chiffres suivants :

	Alcool.	Accroissement d'acidité par litre.		Sucre disparu par litre.	Mannite formée par litre.
		Totale	Volatile		
	—	—	—	—	—
1	0	5gr,89	3gr,42	25gr,30	18gr,92
2	4,6 0/0	5, 00	3, 08	23, 05	17, 05
3	9,2	2, 73	2, 83	14, 49	8, 72
4	12,1	2, 37	2, 25	11, 35	7, 98
5	14,5	traces	néant	traces	traces.

Le ferment se multiplie donc d'autant moins que la richesse alcoolique initiale est plus grande ; ici, où le liquide ne renfermait que 44 grammes de sucre et 1gr,73 d'acidité par litre, il a été complètement paralysé par 14 0/0 d'alcool.

Il est certainement insensibilisé par une dose moins forte d'alcool dans une cuve de vendange, où l'acidité naturelle du moût et sa richesse saccharine concourent à diminuer son activité.

Il en résulte que, pour éviter autant que possible dans la pratique la maladie des vins mannités, il faut favoriser tout d'abord et exclusivement la fermentation alcoolique. Pour cela, la température dans la cuve doit être abaissée, s'il est nécessaire, par une circulation d'eau froide ou par tout autre procédé, de manière qu'elle reste inférieure à 30° pendant toute la durée de la fermentation.

Cette pratique, qui tend d'ailleurs à se généraliser en Algérie, a l'avantage de conserver à la levure de vin toute son activité et toute sa puissance, de donner du vin complètement fermenté et d'éloigner, avec le ferment mannitique, tous les autres germes de maladie.

Il reste à démontrer que, contrairement à l'opinion de certains auteurs, la maladie des vins mannités n'est pas la même que celle des vins tournés. Les différences sont en effet très nombreuses ; voici les principales :

1° Le ferment mannitique diffère par sa forme, la dimension et le mode de groupement de ses articles du ferment de la tourne, tel qu'il est représenté dans les *Études sur le vin* de M. Pasteur et dans la *Revue de viticulture* du 30 décembre 1893;

2° Il ne se développe pas dans les vins non sucrés, où le ferment de la tourne se cultive facilement;

3° Celui-ci, par contre, ne se développe pas dans les liquides sucrés naturels ou artificiels, qui conviennent parfaitement au premier;

4° Les acides volatils produits pendant la fermentation mannitique pure sont constitués exclusivement, comme on l'a vu, par de l'acide acétique, tandis que dans les vins tournés, comme l'a montré M. Duclaux, ils sont formés par un mélange d'acide propionique et d'acide acétique;

5° Tandis que la crème de tartre disparaît dans les vins tournés, au contraire elle n'est pas décomposée par le ferment de la mannite; nous l'avons retrouvée intégralement dans les moûts de raisin et dans des liquides artificiellement tartarisés, même après plusieurs jours de fermentation.

D'ailleurs, si le liquide de culture, quoique tartarisé, ne renferme pas de sucre, le ferment mannitique ne s'y développe pas, pas plus que dans une simple dissolution de bouillon Liebig.

En résumé, la formation de la mannite dans les vins ne résulte pas d'une réaction purement chimique; elle est le produit d'une fermentation spéciale, distincte de la tourne; par conséquent, les vins mannités doivent être considérés comme des vins malades, au même titre que des vins piqués ou tournés. Mais, tandis que ces dernières maladies ne se développent qu'avec le temps, en barriques ou en bouteilles, l'altération mannitique, au contraire, se manifeste dans la cuve même et continue à s'accuser tant qu'il reste dans le vin du sucre à transformer. Les premières peuvent être prévenues par les soins donnés au vin et par la pasteurisation; celle-ci ne peut être évitée que par une surveillance attentive de la température dans la cuve de vendange.

REVUES ET ANALYSES

LA PURIFICATION SPONTANÉE DES EAUX DE FLEUVES

REVUE CRITIQUE

Le char du progrès a des roues carrées et ne marche que par soubresauts. Quand on lui confie une idée, il l'enlève et la laisse retomber plusieurs fois de suite ; si elle résiste à ces chocs, c'est qu'elle est bonne, et il l'emporte. L'histoire des eaux potables fournit un bon exemple de ces oscillations. Dès que la chimie a su assurer ses premiers pas, elle s'est demandé les raisons de la préférence que les hommes ont toujours accordée à certaines eaux et de la défiance dans laquelle ils en tenaient d'autres. Comme la science n'était encore mûre que pour l'analyse minérale, c'est dans cette voie qu'elle a cherché et a su trouver l'explication cherchée. A ce moment, on n'ajoutait encore aucune importance à la matière organique qu'on rencontre en plus ou moins grande abondance dans toutes les eaux. Ce n'est que plus tard, lorsque les idées de Liebig eurent fait attribuer aux substances en voie de décomposition les fermentations et un certain nombre de maladies, qu'on arriva à se méfier de cette matière organique, et comme il eût été impossible de distinguer la bonne de la mauvaise, on les proscrivit toutes deux. L'aération de l'eau étant considérée comme un bon moyen de s'opposer à sa putréfaction, c'est de cette époque que date l'opinion que les eaux de rivière, largement aérées par le mouvement, sont préférables aux eaux de source, et c'est sur cette opinion, longtemps considérée comme sûre, que beaucoup de grandes villes ont établi leur canalisation d'eaux potables.

Sur ce point comme sur tant d'autres, les idées de M. Pasteur ont lancé la science dans des voies nouvelles. En renversant la doctrine de Liebig sur les fermentations et les putréfactions, en montrant que la matière organique ne jouait qu'un rôle passif dans ces phénomènes, et que la cause en était vivante, il nous a donné la crainte des ferments comme le commencement de la sagesse. Du coup, le nombre des bactéries par centimètre cube est devenu le principal élément d'appréciation du mérite d'une eau, les eaux de sources ont refoulé au

second plan les eaux de rivière, et les villes qui, sur la foi des traités, avaient emprunté leur eau de boisson aux fleuves qui les arrosent, se sont vues conviées à les chercher ailleurs.

Peut-être auraient-elles le droit de se plaindre du caractère un peu trop affirmatif des diverses théories qu'elles ont dû écouter successivement. Un fait nouveau qui apparaît dans la science semble, au premier abord, tout dominer et détruire autour de lui : il est là tout près, et cache l'horizon : mais il ne conserve ces proportions colossales que pour ceux qui s'immobilisent autour de lui. Seul, le savant qui pousse sa recherche plus loin le voit peu à peu reprendre ses proportions, et se fait une juste idée de sa véritable place. En revenant aujourd'hui sur l'histoire de ce passé, si peu ancien, de l'histoire des eaux potables, on peut se dire que tout le monde a eu raison successivement ; les anciens chimistes de refuser les eaux trop chargées de matières minérales ; les élèves de Liebig d'exiger la pureté organique et l'aération ; les hygiénistes de la nouvelle école de demander des eaux privées de germes. Le jugement à porter sur une eau dépend de tous ces éléments envisagés à la fois, et ce n'est que par une fausse interprétation des enseignements de la science qu'on a pu condamner ou absoudre au nom de l'un deux, même du dernier venu et du plus assuré.

C'est ainsi, par exemple, qu'il n'est pas du tout certain que l'eau de tel fleuve ne soit pas de beaucoup supérieure à l'eau de telle source. La mémoire et l'imagination sont remplies à ce sujet-là d'une foule de clichés : les sources fraîches naissant sous la mousse ; les fleuves servant de dépotoir aux grandes villes, les claires fontaines, les noirs égouts, etc., etc. Mais l'imagination n'est pas seule à parler. Il y a aussi les faits. Comment se fait-il que la Seine soit parfois un si beau fleuve entre Rouen et la mer? Comment se fait-il qu'à Mantes elle ait repris la limpidité qu'elle a en amont de Paris? Si elle conservait tout ce qu'on lui jette d'immondices, dans toutes les villes qu'elle arrose, elle devrait se salir de plus en plus. Nous voyons au contraire qu'elle s'épure. A quoi est due cette épuration spontanée et naturelle des fleuves et rivières? Quelques renseignements sur ce point ne seront peut-être pas inutiles.

Cette épuration porte à la fois sur la quantité des matières organiques dissoutes et sur le nombre de germes présents dans l'eau. Sur le premier point, j'ai fait remarquer dans ma *Microbiologie* que la presque totalité de la matière organique soluble qu'on trouvait dans les 250,000 mètres cubes d'eau d'égout que Paris vomit chaque jour, à savoir au minimum 250,000 kilogrammes, disparaissait sous l'action des ferments dans le court trajet entre Paris et Meulan ; et ce minimum

est sans doute éloigné de la réalité, car ces eaux d'égout emportent encore 500,000 kilogrammes de matières en suspension qui se déposent en route, mais que les dragages de la Seine n'enlèvent que pour une faible partie, et dont les trois quarts au moins se trouvent gazéifiés ou dissous par le travail des ferments, de sorte que nous avons là, aux portes de Paris, une cuve de fermentation qui détruit plus de matière organique en un jour qu'il n'en fermente dans tous les vignobles de France un jour de vendanges.

Au sujet de la diminution du nombre des germes vivants, je ne connais pas de travail méthodique concernant la Seine, mais nous pouvons trouver des documents sur ce point dans les études de Prausnitz [1] sur les eaux de l'Isar. L'Isar est un fleuve à cours rapide, qui, en traversant Munich, se divise en plusieurs bras et reçoit à gauche et à droite plusieurs égouts, dont le dernier vient aboutir à Unterföhring. En ce point, à 7 kilomètres au-dessous de Munich, le fleuve, qui est entré en ville avec 305 germes par c. c., en contient 12,600 environ, en moyenne. Ce nombre tombe à 9,100 environ à Ismanning, à 13 kilomètres de Munich. Il est de 4,800 à Erching, à 22 kilomètres, et de 2,400 à Freising, à 33 kilomètres de Munich. Le fleuve ne met que 8 heures à parcourir cette distance, et ce temps lui suffit, comme on voit, à se dépouiller des 5/6 de ses germes vivants. Notons que, dans cet intervalle, il ne reçoit pas d'affluent nouveau, au moins autant qu'on peut le voir sur une carte à grande échelle.

On trouverait évidemment des faits de même ordre pour tous les fleuves, et ce qu'il y a d'intéressant, c'est d'étudier les causes de cette purification spontanée en matières organiques et en microbes. Celles que nous connaissons sont assez nombreuses et peuvent être rangées sous divers chefs. Il y a d'abord les actions physiques. Des rivières peuvent s'épurer, soit parce qu'elles laissent déposer, pendant leurs périodes de tranquillité relative, les matières flottantes et les microbes qu'elles tiennent en suspension, soit parce qu'elles se mélangent, sur leur parcours, à des eaux de fond qui, filtrées au travers du sol, leur arrivent avec une pureté relative, parfois très grande. Donc influence possible du dépôt des particules flottantes ou de la pureté des eaux souterraines. Viennent ensuite des actions chimiques : l'influence de l'oxydation organique en présence ou en l'absence de la lumière. Viennent enfin les actions vitales proprement dites, l'influence de la concurrence entre les microbes, avec lesquels le dernier mot appartient toujours aux espèces les plus aérobies, et par conséquent en moyenne les plus inoffensives. A ces divisions principales se rattachent des subdivisions qu'il est nécessaire d'examiner d'un peu près.

1. L'*Influence de la canalisation de Munich sur l'Isar*. Munich, 1889.

I. — Actions physiques.

Eaux de fond. — Je commencerai par la plus courte de ces études, celle de l'influence du mélange de l'eau du fleuve avec les eaux souterraines. J'ai insisté à plusieurs reprises, dans ces *Annales*, sur l'origine et la qualité de ces eaux. Nous savons qu'elles proviennent de l'infiltration des pluies, dont partie pénètre plus ou moins profondément jusqu'à ce qu'elle rencontre une couche imperméable, à la surface de laquelle elle circule en suivant ses lignes de plus grande pente, souvent très différentes des lignes de plus grande pente de la surface. Quand cette couche imperméable vient affleurer le sol, son intersection avec lui forme un *cordon de sources*. Une autre portion des eaux pluviales circule à petite profondeur en suivant le relief de la surface. Sur les flancs d'une vallée, elle coule lentement sur les pentes, y alimente les puits, et vient peu à peu se réunir à la rivière ou au fleuve qui coule au fond, en y pénétrant soit par les bords, soit par le fond même du lit. Quand on a pratiqué des galeries latérales au fleuve pour en filtrer l'eau, c'est presque toujours elle qui les remplit. Cette eau arrive d'ordinaire assez bien filtrée et épurée par son long contact avec le sol, et il semble, au premier abord, qu'elle amène seulement une dilution des eaux impures du fleuve, et non une purification. Mais elle apporte avec elle deux éléments dont nous verrons bientôt l'influence favorable : sa température, plus basse en été que celle des eaux courantes, et sa composition chimique, capable d'influencer les autres actions épuratrices que nous allons faire entrer en ligne de compte.

Dépôt des particules flottantes. — Microbes et corps en suspension sont plus lourds que l'eau et tombent par le repos; en général, ils tombent d'autant plus vite qu'ils sont plus gros, mais ce serait mal comprendre le phénomène que d'y voir seulement une question de densité. Il y a aussi une question d'attraction moléculaire entre le liquide et les particules très ténues qu'il contient. La preuve, c'est que quelques millièmes d'alun éclaircissent rapidement une eau ordinaire dans laquelle un précipité d'argile reste obstinément en suspension. La variation produite dans la densité est pourtant insignifiante. Ce qui a beaucoup varié en revanche, à la suite de l'addition de l'alun, c'est l'adhésion réciproque de l'eau pour les molécules d'argile, et nous retrouvons là, entre liquide et solides, ces adhésions moléculaires sur lesquelles j'ai si souvent insisté dans ces *Annales*.

Ce sont les mêmes qui s'exercent entre solides et solides, et qui, lorsqu'on agite de l'eau au contact d'un corps poreux et absorbant, ou lorsqu'on la force à passer au travers d'une matière finement

divisée formant filtre, provoque l'adhésion aux parois solides des éléments vivants et inanimés en suspension dans l'eau. Il n'est même pas nécessaire que la paroi soit poreuse pour que le phénomène se produise. Quand on *fixe* une préparation de microbes sur une lamelle en la desséchant et la chauffant, on met en jeu des forces de la même nature. Quand M. Certes, pour recueillir les infusoires présents en petite quantité dans une eau, y fait tomber à plusieurs reprises une lamelle de verre qui happe au passage ceux qu'elle rencontre, et finit par en rapporter beaucoup, ce sont encore ces lois de fixation de solide sur solide qui entrent en jeu. Mais pour multiplier les chances de fixation, il faut évidemment multiplier le plus possible les surfaces, et pour cela les corps poreux sont préférables aux corps à surface lisse. Par contre, il y a des corps encore préférables aux corps poreux. Ce sont les corps à l'état gélatineux, carbonate de chaux au moment où il se forme, alumine, sesquioxyde de fer, silice, etc. Tous ces corps *collent* l'eau dans laquelle ils prennent naissance, et entraînent, dans les mailles du réseau qu'ils forment en se précipitant, les corps solides, les germes de microbes, et même quelques éléments en solution. De nombreux procédés d'épuration de l'eau ont été basés sur ces propriétés, et ces dernières années en ont vu éclore beaucoup. Il serait trop long de les énumérer tous : je citerai seulement, parmi ceux qui ont été employés sur une large échelle, le procédé ancien de Clark, basé sur la précipitation au moyen de l'eau de chaux, et le procédé Anderson, dans lequel on détermine dans l'eau un précipité purificateur de sesquioxyde de fer gélatineux, en agitant cette eau au contact de copeaux de fer, et en la laissant s'oxyder et se reposer ensuite.

Des actions du même ordre sont constamment en jeu dans la nature. Voici une rivière traversant des prairies tourbeuses : elle en sort chargée de matières organiques et d'acide carbonique. Si elle rencontre ensuite du carbonate de chaux sur les rives ou les cailloux de son lit, elle va le dissoudre pour le déposer un peu plus loin sous forme de masses demi-glaireuses, formées d'un feutrage minéral imprégné de matière organique : c'est de l'auto-épuration. Voici, dans un fleuve chargé d'argile, des eaux de fond qui viennent sourdre avec des chlorures ou des sels ammoniacaux, ou encore, dans un fleuve contenant des matières organiques, des eaux ayant dissous, dans les couches terrestres qu'elles ont traversées, du bicarbonate de chaux ou des sels de fer : un dépôt va se former qui entraînera tout ou partie des éléments en suspension ou même en solution : ce sera encore une épuration naturelle.

S'il faut des exemples pour justifier l'importance accordée à ces phénomènes naturels, on n'a pour ainsi dire que l'embarras du choix. Nous citerons seulement les résultats des expériences de M. P. Fran-

kland[1], parce qu'elles ont été à la fois très étendues et très méthodiques. Faites par la méthode des plaques, elles ont porté sur divers procédés de purification, et on trouvera dans les tableaux suivants, à côté du mode de purification mis en œuvre, le nombre de germes par centimètre cube avant et après l'opération, et la réduction subie.

Agitation d'un quart d'heure avec des particules solides.

		Germes avant.	Germes après.	Réduction 0/0.
Avec	1/20 de fer spongieux..	609	63	90
—	1/15 de craie...........	155	10	93
—	1/15 de charbon animal.	8000	60	99
—	1/15 de charbon de bois.	3000	120	96
—	1/15 de coke fin........	∞	0	100

Précipitations industrielles. — Méthode de Clark.

M. Frankland a étudié aux *Colne Valley Waterworks* la méthode de Clark, c'est-à-dire le mélange, avec de l'eau de chaux, de l'eau qu'on se propose d'adoucir, et, dans une raffinerie, une modification apportée à la méthode de Clark par MM. Gaillet et Huet, qui consiste essentiellement à ajouter à l'eau de chaux une certaine quantité de soude, et à accélérer le dépôt de carbonate de chaux par une circulation entre des chicanes.

	Germes avant.	Germes après.	Réduction 0/0.
Méthode de Clark, 2 jours de repos....	322	4	99
— Gaillet et Huet, après 2 heures.	182	4	98

Ces exemples, de même que ceux qu'on peut tirer d'un travail de Bruno Krüger déjà analysé dans ces *Annales* (t. II, p. 621), suffisent à démontrer l'influence purificatrice des dépôts calcaires ou ocreux qui peuvent prendre naissance dans les eaux courantes. Mais ici se présente une remarque importante. Les forces qui président à ces précipitations par entraînement sont, comme nous l'avons dit, des adhésions moléculaires, dont on connaît, d'autre part, la curieuse instabilité.

Les plus légers changements dans la composition d'une eau, dans la nature de ses microbes, de sa matière organique, peuvent renverser le jeu de ces adhésions. Les mêmes opérations et les mêmes matériaux ne produiront donc pas nécessairement partout les mêmes effets. Je trouve dans le mémoire de M. Frankland un exemple curieux de ce fait. Nous avons vu, dans un des tableaux qui précèdent, du coke pulvérisé réduire à zéro l'énorme population microbienne d'une eau qu'on avait mélangée avec quelques gouttes d'urine putréfiée. En y mélangeant au contraire de l'eau de macération d'un sol, on a vu que le

1. Sur la purification de l'eau. *Proceed. of the Institution of civil Engineers*, t. 85, 1886.

même mode de traitement n'avait aucun effet, et même que le nombre des organismes de l'eau, qui s'élevait à l'origine à 3,000 par c. c., montait à 20,000 après agitation avec le coke et vingt-six heures de repos. Il est clair qu'ici les organismes n'avaient pas contracté d'adhésion avec le coke, étaient restés dans le liquide et y avaient pullulé en liberté. Le cas n'a rien d'embarrassant : il est, au regard de la matière vivante, l'équivalent exact de ce qu'est, au regard du dépôt des matières argileuses, la présence ou l'absence de quelques millièmes d'alun dans le liquide.

Nous allons retrouver cette même contingence en étudiant le lent dépôt que forment les microbes lorsqu'ils sont abandonnés à eux-mêmes dans une eau où ils ne sont entraînés par aucun précipité. Ici encore, je citerai les expériences de M. P. Frankland, faites dans les grands bassins de décantation de la *New River Company* et de la *West Middlesex Company*.

New River Company.

Eau à l'entrée dans le 1er réservoir.	677	germes	par c. c.
— à la sortie du 1er —	560	—	—
— — 2e —	183	—	—

West Middlesex Company.

Eau de la Tamise à Hampton.......	1437	germes	par c. c.
— après passage au 1er réservoir.	318	—	—
— — 2e —	177	—	—

On voit tout de suite que l'action purificatrice est loin d'être aussi rapide et aussi complète que tout à l'heure, et nous pourrions, encore ici, mettre en regard de ces résultats, d'autres exemples dans lesquels le nombre des bactéries, au lieu de diminuer, a augmenté par le repos à la suite d'une multiplication. Mais il est inutile de revenir sur ce sujet, car je l'ai traité, il n'y a pas longtemps[1], en l'envisageant il est vrai à rebours, sous le nom d'influence du mouvement sur la multiplication des bactéries ; mais c'est au fond la même chose. Dans une eau en repos, au fond de laquelle un précipité ou une action quelconque les a entraînées, les bactéries sont en grand nombre en présence d'une faible quantité de matière alimentaire et se gênent par leurs produits de sécrétion. Leur multiplication a donc de ce fait des raisons de rester lente. Dans un liquide en mouvement, ou dans un liquide en repos où leurs adhésions moléculaires les ont laissés emmaillottés, les germes se multiplient plus ou moins abondamment suivant les circonstances et les conditions de culture, température, aération, dose et nature de la matière organique, etc. Là où une espèce s'éteint une autre peut prospérer. Dans des expériences ayant un autre

1. Voir ces *Annales*, t. VI, p. 55.

objet et que nous retrouverons bientôt, Buchner[1] voyait, en introduisant dans une eau en repos des germes du *B. Pyocyaneus*, du B. typhique et du *B. coli*, le premier se multiplier abondamment, tandis que les autres périssaient après deux ou trois jours. De même, dans une eau en mouvement, des bacilles du choléra et du typhus peuvent comme l'a vu Schmidt[2], se multiplier comme si elle était en repos, alors que des bacilles anaérobies, comme le vibrion septique, y disparaîtraient vite, grâce au contact renouvelé avec l'oxygène de l'air. Par contre, ce même mouvement, mortel pour ce vibrion dans une eau aérée, ne le serait plus dans une eau chargée d'acide carbonique. Il n'y a donc pas de règle absolue, et tous les résultats contradictoires qu'on a accumulés dans cet ordre de recherches ne le sont qu'en apparence, et parce qu'on n'a pas tenu un compte suffisamment exact des influences qui peuvent entrer en jeu.

De tout ce qui précède, nous pouvons conclure pourtant que la purification des eaux est bien mieux assurée lorsqu'il y a formation d'un précipité organique ou minéral que lorsque les microbes y sont abandonnés aux seules forces de la pesanteur ou des adhésions moléculaires. Mais même dans ce cas, il y a encore de la ressource. C'est un fait aujourd'hui bien connu qu'après avoir envahi une eau, les microbes y périssent ensuite, soit parce qu'ils en ont consommé toute la matière utilisable, soit parce qu'ils se sont créé un milieu défavorable. L'envahissement d'une eau est donc une façon d'épuration, et la putréfaction elle-même purifie. L'important est de ne prendre l'eau que lorsque ce phénomène y est terminé, et à ce point de vue, il n'y a aucune raison *a priori* pour que l'eau d'un fleuve qui a reçu les égouts d'une grande ville, ne redevienne pas, lorsqu'il a eu le temps d'épuiser ses causes de contamination, aussi acceptable que l'eau qui a traversé le fumier d'une ferme et s'est infiltrée dans le sol pendant le temps nécessaire pour s'épurer. Mais nous quittons là le domaine des actions physiques pour entrer dans celui des actions vitales, que nous allons aborder renvoyant à un autre article le chapitre des actions physiques, qui est plus long et ne peut être bien compris que si nous connaissons les deux autres.

II. — Actions vitales.

Je n'aurais pas songé à aborder ce sujet, qui n'est au fond que le sujet déjà très rebattu de la concurrence vitale entre les microbes,

1. Influence de la lumière sur les bactéries et l'auto-dépuration des fleuves. *Archiv f. Hygiene*, t. 17, 1892, p. 184.

2. Sur l'influence du mouvement sur la croissance et la virulence des microbes. *Ibid.*, t. XIII, p. 247.

s'il ne prenait, quand il s'agit de la purification spontanée des eaux potables, une physionomie très simple, que des travaux récents me semblent avoir un peu altérée.

Comme je le disais tout à l'heure, le travail des microbes, même des plus malodorants, est avant tout un travail de purification, et on peut dire que quand une eau contient de la matière organique, il n'y a pas de précipitation chimique ni de filtration poreuse, si parfaite qu'elle soit, qui vaille une bonne invasion de germes et une impureté passagère, parce que l'eau filtrée ou décantée, conservant la plus grande partie sinon la totalité, de la matière organique, sera constamment exposée à recevoir et à nourrir des germes qui pourront être nocifs, tandis qu'une fois purifiée par des espèces banales, elle sera devenue un milieu résistant ou impropre à toute implantation nouvelle. Quand quelques générations de ferment y ont collaboré ou s'y sont succédé, la matière organique primitive a été brûlée et a pris des formes plus simples. Ce qu'on appelle l'azote albuminoïde a diminué ou a disparu, l'azote ammoniacal y a augmenté, et, si les ferments nitreux et nitriques ont pu terminer ce travail, l'azote ammoniacal lui-même est remplacé plus ou moins complètement par de l'azote nitreux ou nitrique. A ce moment l'eau, si elle est limpide et contient peu de germes, ce qui est d'ordinaire le cas, est une eau potable de premier ordre, et peut nourrir les diatomées, les algues vertes, les végétaux, microscopiques ou non, qui ont la faculté de créer leur matière vivante aux dépens de l'acide carbonique de l'air, de l'ammoniaque ou des nitrates des eaux. Les espèces qui la peuplent alors sont considérées comme salutaires, et les eaux dites assez pures pour nourrir des algues et des diatomées sont celles qu'on recherche partout.

Mais il ne faudrait pas en conclure que ce sont les algues et les diatomées qui purifient l'eau, comme l'ont fait Lœw[1], et à sa suite Pettenkofer. Divers savants ont montré, je le sais bien, que les végétaux chlorophylliens peuvent se nourrir aux dépens d'autres matériaux carbonés et azotés que l'acide carbonique et les nitrates, consommer des sucres, des combinaisons amidées, de l'asparagine, de l'urée, etc. Mais il a fallu, pour leur trouver ces propriétés, les mettre à l'abri de toute concurrence vitale. Dans la nature, ils sont en lutte avec des espèces microscopiques mieux outillées qu'eux-mêmes pour utiliser et détruire ces substances encore complexes, et leur part dans la purification de l'eau est bien réduite, si elle existe encore. Dans le cycle complet de microbes qui commence par les anaérobies et la fermentation à l'abri de l'air, qui se poursuit par les aérobies et les

1. Sur la question de l'auto-dépuration des fleuves *Archiv. f. Hyg.*, t. XVII, p. 259.

combustions vitales à l'aide de l'oxygène de l'air, ils n'arrivent que lorsque ces derniers ont à peu près terminé leur action. Qu'ils puissent les aider pour déblayer définitivement le terrain, cela est possible et même probable, car il n'y a pas de frontières entre les fonctions des espèces vivantes, mais au contraire, une imbrication compliquée des unes dans les autres. Dans l'ensemble, ces irrégularités de bordure disparaissent, et les groupes apparaissent bien nuancés. Les ferments anaérobies produisent des dislocations intérieures, et l'oxygène de l'acide carbonique qu'ils dégagent provient en presque totalité de la matière fermentescible; les aérobies font des combustions à l'air libre. l'oxygène de leur acide carbonique provient en presque totalité de l'air extérieur. Les êtres microscopiques chlorophylliens reprennent cet acide carbonique, en dégagent de l'oxygène, et aèrent ainsi l'eau ambiante. Ils peuvent entrer en symbiose avec les aérobies : ils entrent rarement en concurrence vitale, parce qu'ils ont toutes chances d'y être écrasés et que même les êtres microscopiques sont de l'école de Panurge, « qui craignait naturellement les coups ».

Ce ne sont pas seulement ces notions théoriques solidement assises qui combattent la manière de voir de Lœw. Uffelmann lui oppose des expériences[1]. En ensemençant dans de l'eau de la Warnow, à Rostock, des algues, des diatomées, et cette *Euglena viridis*, l'infusoire bien connu, auquel Lœw avait surtout attribué l'épuration des eaux superficielles, il n'a observé qu'une diminution insignifiante dans la quantité de matière organique et qu'une décroissance très faible dans le nombre des bactéries, alors que le nombre des algues avait certainement augmenté, à en juger par la couche de matière verte qui recouvrait les parois des vases. A vrai dire, il n'y a pas grand'chose à tirer de cette expérience. Alors même qu'elle aurait réussi, c'est-à-dire qu'on aurait constaté la coexistence de la diminution de la matière organique et de l'augmentation de la matière verte, il aurait encore fallu se demander si les deux phénomènes dépendaient l'un de l'autre, et s'il n'y avait pas entre les deux un rouage intermédiaire : dans l'espèce, celui des microbes aérobies.

Un autre point visé par M. Uffelmann mérite une mention spéciale : c'est l'influence possible des gros infusoires flagellés et des amibes. De ces êtres, les uns englobent des fragments, parfois volumineux, de matières organiques encore complexes ; les autres sont carnivores, s'alimentent de proies vivantes, et absorbent et détruisent de grandes quantités de bactéries. Mais si on veut pour cela leur faire une place à part, il faut faire aussi une place zoologique à part aux brochets dans un vivier rempli de petits poissons. A envisager les choses

1. La purification spontanée des fleuves. *Berl. klin. Wochenschr.*, 1892, p. 423.

en gros, comme on est obligé de le faire dans une étude générale, il n'y a aucune différence essentielle entre un kolpode qui absorbe et digère un fragment de matière organique, et un bataillon de bactéries qui le dissolvent avant de l'absorber. Ces gros infusoires sont en outre presque tous des aérobies qui ne peuvent vivre dans un liquide fermentescible ou putréfiable que lorsque l'oxygène peut pénétrer avec eux dans les profondeurs. Aussi restent-ils cantonnés à la surface, pour peu que le liquide soit riche en matière organique et les expose à la concurrence vitale des ferments. Dans une infusion végétale de foin, où leurs germes enkystés sont présents dès l'origine, ils ne se développent pas les premiers, et attendent que les bactéries aient, en pullulant, formé à la surface une couche grouillante de vie où les flagellcs se promènent en animaux de proie. Ce n'est encore que dans les eaux très pures qu'on trouve des amibes à une certaine profondeur.

En somme, l'épuration de l'eau par les microbes est le procédé général de la nature, celui qu'elle emploie non seulement dans les eaux, mais partout, pour restituer au monde inorganique les éléments de la matière vivante. Grâce à l'ubiquité des germes, on peut admettre que toute substance, organisée ou organique, devient la proie des êtres les mieux faits pour en tirer parti. Nous n'avons à redouter, dans ce phénomène général, que les déviations qu'il subit parfois, absolument comme nous avons à craindre, dans le concours normal de cellules qui constitue l'état de santé, de voir s'introduire ce trouble qui constitue la maladie. Mais cela n'empêche pas que les microbes ne soient, dans les eaux comme ailleurs, l'agent vital de dépuration. Les actions physiques que nous avons signalées peuvent jouer un plus ou moins grand rôle : elles n'en sont pas moins l'exception. Les microbes sont la règle, et on a en principe tort de se plaindre quand on en trouve au fond des galeries filtrantes ou sur les parois des vases de filtration. C'est parce qu'il y en a là qu'on est moins exposé à en trouver dans l'eau qui circule, et presque toujours, celle-ci ne devient potable qu'à la condition d'avoir été habitée et temporairement impotable.

DUCLAUX.

INSTITUT PASTEUR

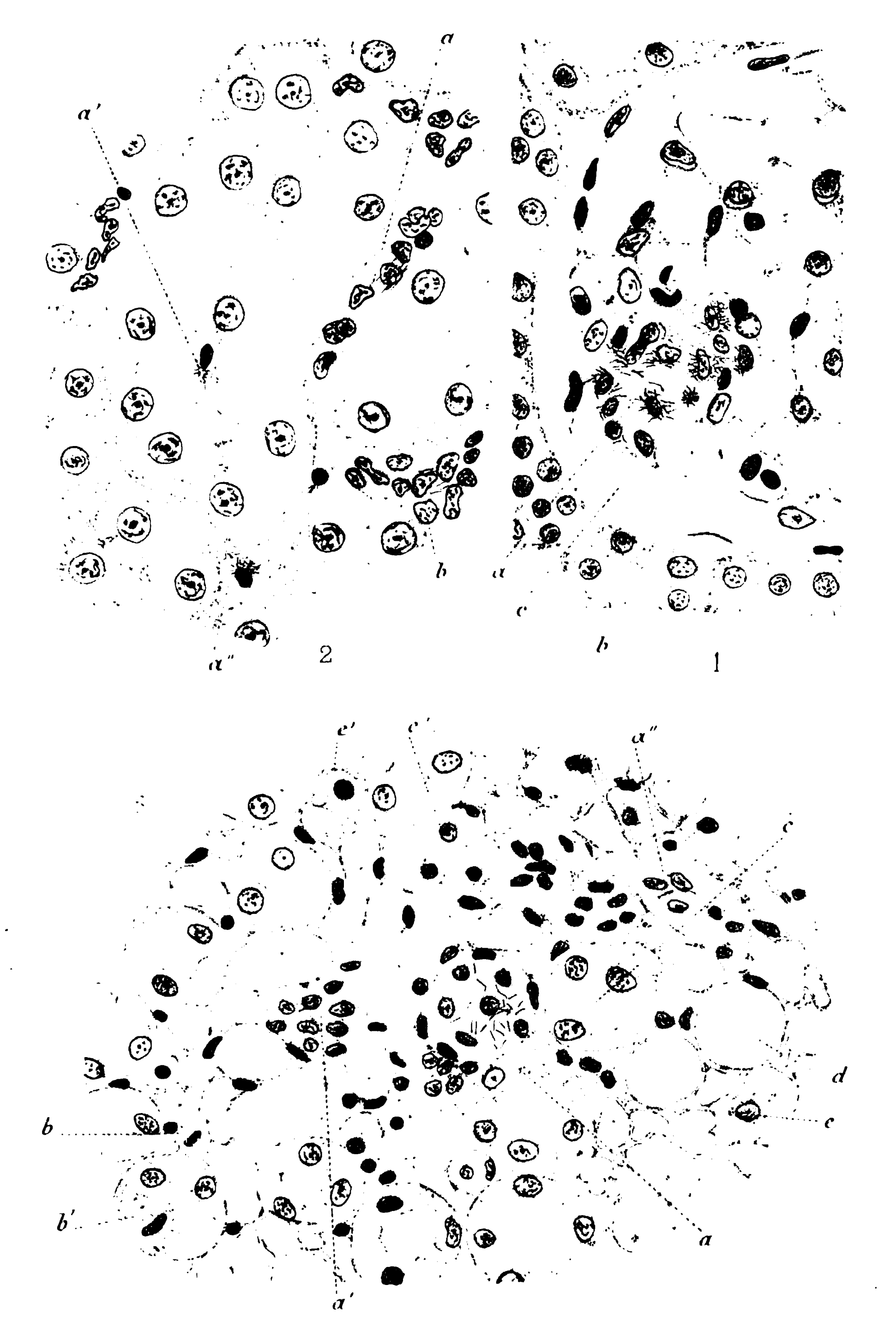
STATISTIQUE[1] DU TRAITEMENT PRÉVENTIF DE LA RAGE — DÉCEMBRE 1893 ET JANVIER 1894.

	A			B			C		
Morsures à la tête et à la figure — simples	»	2	3	»	8	12	»	»	2
Morsures à la tête et à la figure — multiples	»	1		»	4		»	2	
Cautérisations efficaces	»	»	»	1	»	»	»	»	»
— *inefficaces*	»	»	»	6	»	»	1	»	»
Pas de cautérisation	3	»	»	5	»	»	1	»	»
Morsures aux mains — simples	»	4	9	»	33	71	»	16	36
Morsures aux mains — multiples	»	5		»	38		»	20	
Cautérisations efficaces	»	»	»	»	»	»	»	»	»
— *inefficaces*	4	»	»	35	»	»	21	»	»
Pas de cautérisation	5	»	»	36	»	»	15	»	»
Morsures aux membres et au tronc — simples	»	1	9	»	21	53	»	10	23
Morsures aux membres et au tronc — multiples	»	8		»	32		»	13	
Cautérisations efficaces	1	»	»	»	»	»	»	»	»
— *inefficaces*	5	»	»	27	»	»	11	»	»
Pas de cautérisation	3	»	»	26	»	»	12	»	»
Habits déchirés	7	»	»	49	»	»	22	»	»
Morsures à nu	2	»	»	4	»	»	1	»	»
Morsures multiples en divers points du corps	»	»	»	»	4	4	»	2	2
Cautérisations efficaces	»	»	»	»	»	»	»	»	»
— *inefficaces*	»	»	»	2	»	»	1	»	»
Pas de cautérisation	»	»	»	2	»	»	1	»	»
Habits déchirés	»	»	»	1	»	»	1	»	»
Morsures à nu	»	»	»	3	»	»	1	»	»
Totaux. — **Français et Algériens**		18	21		110	140		53	63
Totaux. — **Etrangers**		3			30			10	
	A			B			C		
TOTAL GÉNÉRAL					121				

1. Les animaux mordeurs ont été : chiens, 211 fois; chats, 11 fois; mulets, 2 fois.

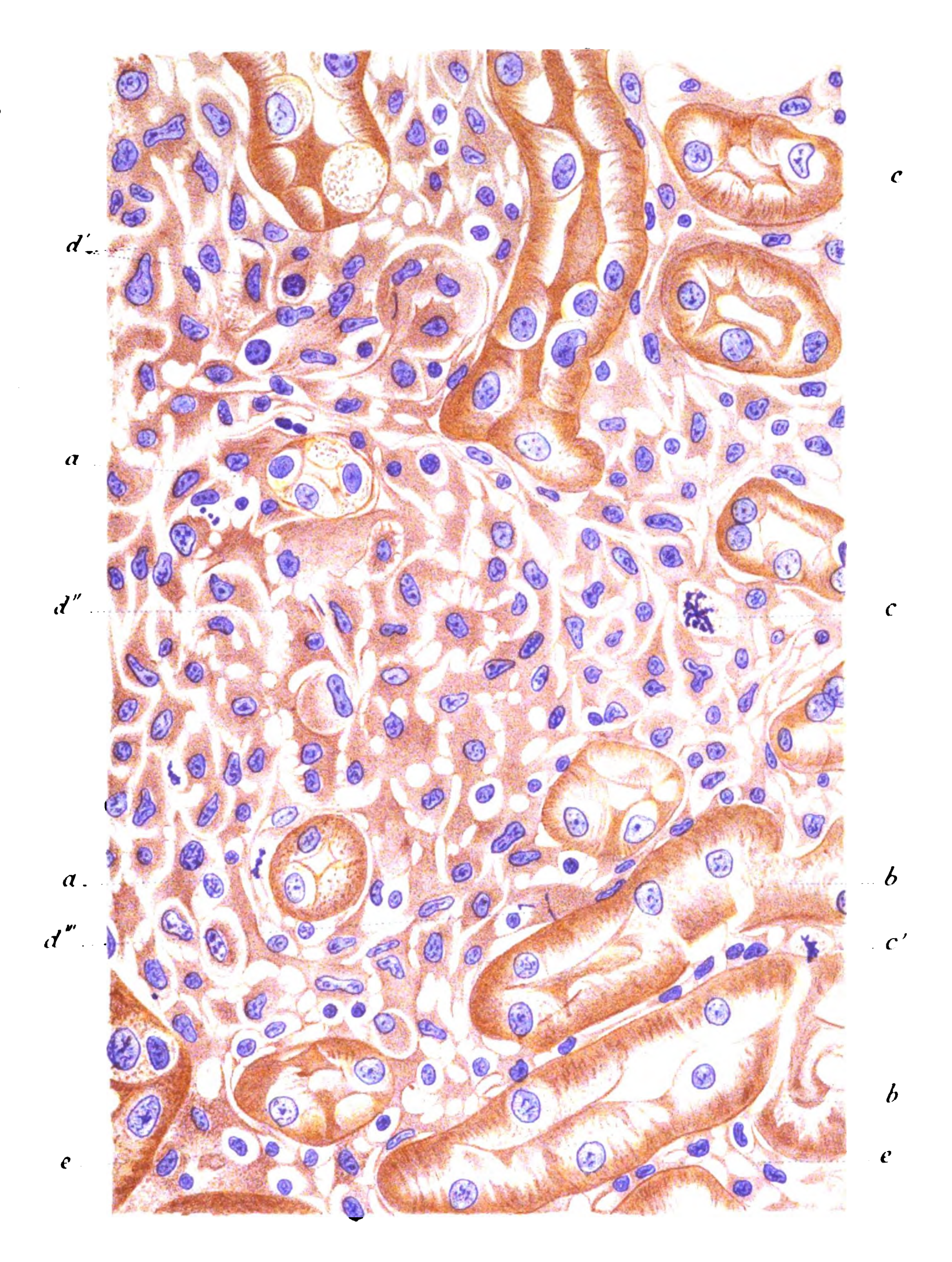
Le Gérant : G. MASSON.

Sceaux. — Imprimerie Charaire et Cie.



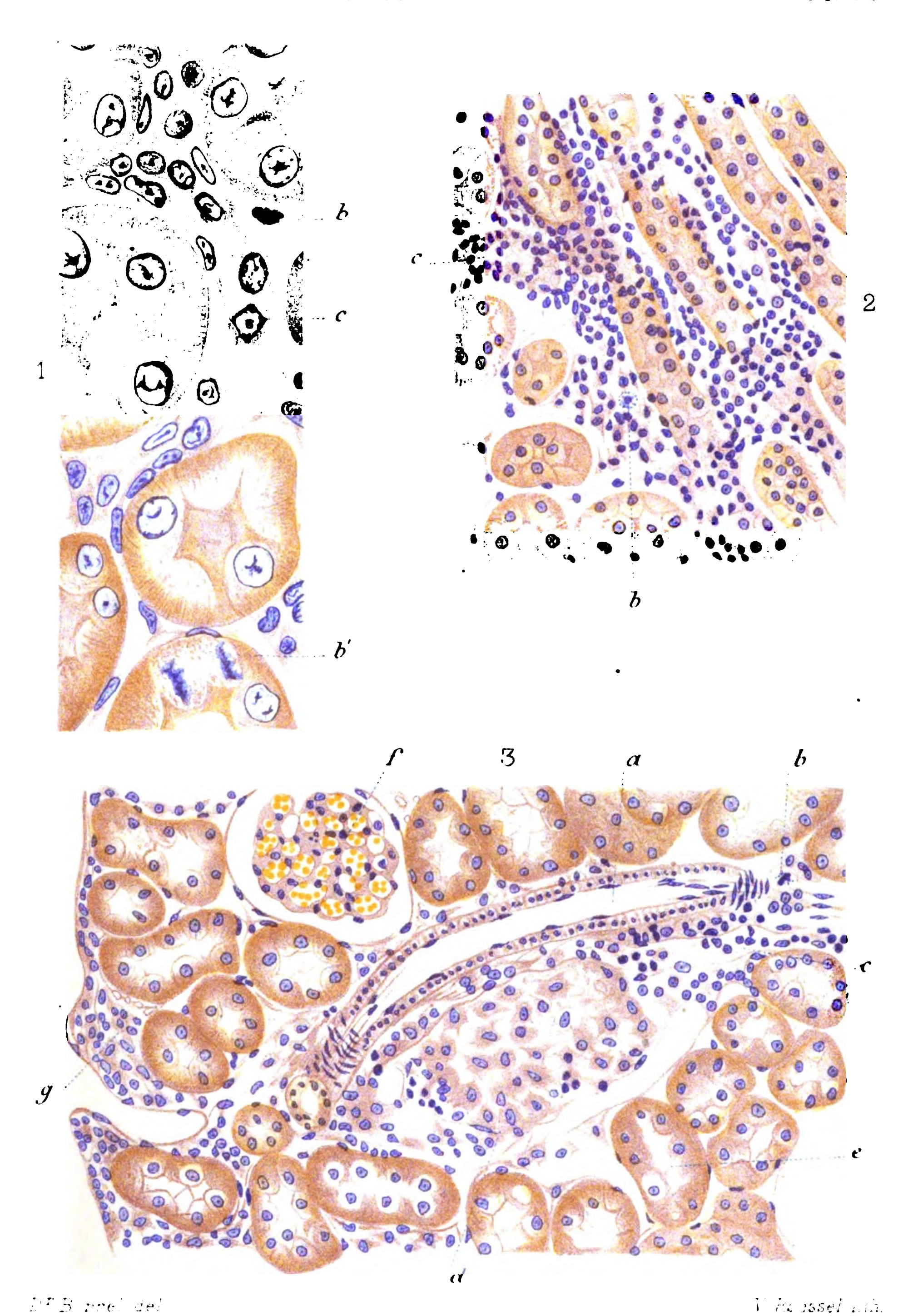
A. Borrel del. V. Roussel lith.

Imp. A. Lafontaine & Fils Paris.



Dr Borrel del. V Roussel lith.

Imp. A. Lafontaine & Fils, Paris.



Dr Borrel del. V. Roussel lith.

Imp. A. Lafontaine & Fils Paris

8me ANNÉE MARS 1894. No 3.

ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

ÉTUDE SUR LE PARASITE DU « PIED DE MADURA »

PAR M. H. VINCENT,

Médecin aide-major de 1re classe.

(Laboratoire de Bactériologie de l'Hôpital militaire du Dey, à Alger.)

I

L'affection connue sous le nom de *Pied de Madura* a été surtout étudiée depuis une vingtaine d'années, et c'est presque exclusivement aux médecins anglais que l'on est redevable de sa description. Bien qu'on ait prétendu que cette maladie singulière se montre exclusivement dans l'Inde, et même qu'elle soit localisée à certains points géographiques de ce pays, comme Madura, Hissar, Bicanir, Dehli, Bombay, Baratpur, etc., il est possible que son domaine s'étende à d'autres régions du globe. Kemper en a, effectivement, rapporté un cas qui s'est développé en Amérique [1]. Bastini et Campana en ont observé un exemple en Italie [2]. Enfin M. Gémy et nous-même avons publié l'observation, avec examen bactériologique, d'un cas de cette maladie apparu chez un Marocain venu en Algérie [3].

La maladie de Madura débute [4], en général, par un gonflement indolore et diffus des téguments du pied : ce gonflement siège indifféremment à la face plantaire ou à la région dorsale,

1. Article *Pied de Madura* de l'*Encycl. intern. de chirurgie*. T. III, p. 19.
2. Cités par KABNER, Préparations cryptogamiques d'un Pied de Madura observé en dehors de l'Inde (*Berliner Klin. Wochenschr.*, 2 février 1891).
3. GÉMY et H. VINCENT. Affection parasitaire du pied, analogue, sinon identique à la maladie dite « de Madura ». (*Congrès de Dermatol. et de Syphiligr.*, 25 avril 1892, et *Annales de Dermatologie*, mai 1892.)
4. *Conf.* : ROUX, *Maladies des pays chauds*, t. III, et de BRUN, même sujet (*Encyclop. Léauté*, 1893).

parfois sur les parties latérales. Après un temps plus ou moins long, on voit se développer, à la surface du pied ainsi tuméfié, de petites tumeurs arrondies, quelques-unes acuminées, offrant le volume d'un pois, d'une petite noisette. D'abord dures, ces nodosités se ramollissent peu à peu, et, tantôt elles peuvent rester en l'état, — c'est la forme la plus douloureuse de l'affection, — tantôt elles se rompent spontanément en donnant issue à du pus sanieux contenant de *petits grumeaux* grisâtres, jaunâtres ou noirs. Dans ce cas, il persiste des pertuis fistuleux. Le pied continue à grossir et à se couvrir de bulles qui s'ouvrent successivement, laissant des orifices suppurants et multiples.

D'après Vandyke Carter [1], Kanthack [2], Boyce et Surveyor [3], Hewlett [4], il faut distinguer deux variétés cliniques du Pied de Madura. L'une est la variété *mélanique*, à grains que Bristowe [5] appelle « truffoïdes », et dans laquelle les corpuscules noyés dans le pus sont de couleur noirâtre; l'autre est la variété *pâle*. Dans cette dernière, les nodules renferment des grains arrondis, jaunes ou blanchâtres, quelquefois rouges.

En 1881, Bristowe avait déjà essayé de donner une description microscopique de ces corpuscules, qu'il trouva formés de tubes mycéliens dirigés dans divers sens. Ces tubes, tantôt transparents, tantôt orangés, se dilatent parfois à leur extrémité et sont pourvus d'étranglements et de cloisons (?).

Vandyke Carter [6] reprit cette étude et publia, en même temps qu'une description clinique complète de la maladie de Madura, les résultats de l'examen histologique de ces grains. Pour lui, ceux-ci sont formés par l'agglomération de filaments appartenant à un *Champignon* ou *Mucor* (*Chionyphe Carteri*) qu'il pensa avoir cultivé, mais qui était, en réalité, une moisissure banale (Lewis et Cunningham [7], A. Kanthack).

Quelle que soit, du reste, la variété morbide sous laquelle elle se présente, la maladie de Madura est d'une durée très

1. Vandyke Carter, *Transactions of pathol. Society*. Londres, 1886.
2. Kanthack, *Ibid.*, 19 janvier 1892.
3. Boyce et Surveyor, *Ibid.*, même année.
4. Hewlett, *Ref. : Bulletin Médical*, 6 juillet 1892, p. 1050.
5. Bristowe, *Transactions of patholog. Society*. Londres, 1881, p. 320.
6. *Loc cit.*
7. *Physiol. and Pathol. Researches* by T. R. Lewis, part i p. 337.
8. Madura disease (mycetoma) and Actinomycosis. (*The Journal of Pathol. and Bacteriol.*, octobre 1892.)

longue et persiste pendant des années. Elle est incurable. La mort peut survenir par suite d'épuisement ou de complications.

II

Le cas qui a été publié par M. Gémy et nous-même répond à la variété pâle de l'affection. Voici, en peu de mots, l'histoire du malade.

Le nommé Ahmed ben Ali, journalier, âgé de 40 ans, entra le 2 janvier 1891 à l'Hôpital civil d'Alger, dans le service de M. le Dr Gémy, professeur de Dermatologie et de Syphiligraphie.

Né au Maroc, le malade a successivement travaillé en Tunisie, en Algérie, en Kabylie, et c'est pendant son séjour en Tunisie qu'il a vu se former, il y a actuellement douze à treize ans, à la région plantaire du pied droit, une série de petites tumeurs qui laissaient sourdre à la pression un liquide rougeâtre, tenant en suspension des grumeaux que le malade compare à des grains de sagou. Les tumeurs, une fois vidées de leur contenu, se cicatrisaient; mais de nouvelles éminences semblables apparaissaient bientôt, soit au voisinage des précédentes, soit en différents points. Le pied se gonflait de plus en plus, devenait très douloureux. La région dorsale, les parties latérales se prenaient à leur tour, et la gêne finit par être assez vive pour interdire tout travail au malade et l'obliger à entrer à l'hôpital.

Actuellement le pied est très volumineux, parsemé de bulles et de nodosités, les unes très dures et douloureuses, les autres ramollies et limitées par un sillon très net. Quelques-unes de ces tumeurs s'ouvrent spontanément et laissent sourdre du pus jaune.

Ajoutons, comme autre particularité, une hyperidrose assez marquée du pied malade, et de l'atrophie des muscles de la jambe correspondante, dont le mollet mesure 5 centimètres de moins que la jambe gauche. Il n'existe aucun retentissement ganglionnaire, soit dans le creux poplité, soit dans l'aine. L'état général est resté bon.

J'ai pratiqué des ensemencements à quatre reprises : la première fois en 1891, les autres fois dans le courant des années 1892 et 1893. Ces recherches bactériologiques, ainsi que l'examen microscopique des tissus et des corpuscules, ont uniformément

décelé, chaque fois, la présence, à l'état pur, d'un microbe dont je vais maintenant décrire les caractères.

a) Examen des corpuscules parasitaires. — A l'œil nu, les grumeaux isolés dans les bulles ou les nodosités du pied, par incision ou par expression de l'une d'elles, ressemblent beaucoup aux grains d'actinomycose. Ils ont le volume d'un grain de semoule, d'une grosse tête d'épingle, sont arrondis ou ovoïdes, de couleur blanc jaunâtre, et ne sont nullement imbibés par le sang ou par le pus au milieu desquels ils s'écoulent. Ecrasé entre les doigts, le corpuscule a une consistance caséeuse. Il est insoluble dans la potasse et dans l'acide acétique.

Etalé sur une lame de verre, il y adhère faiblement. Lorsqu'on examine au microscope cette préparation, après coloration par le liquide de Löffler ou par la fuchsine, on voit, à un grossissement de 400 à 500 diamètres, que la presque totalité de la préparation est parsemée d'innombrables filaments étroitement enchevêtrés ou de débris mycéliens. En un mot, *les corpuscules caractéristiques sont constitués tout entiers par un fin mycelium, très dense, et résultant de l'intrication de ces filaments.*

A la périphérie des touffes ou encore dans les points où celles-ci sont moins compactes, les filaments, droits ou flexueux, apparaissent *pourvus de ramifications.* Du rameau principal partent des rameaux secondaires qui s'y insèrent à angle variable : cette ramification est *vraie.* Il s'agit donc, en conséquence, d'un parasite appartenant au genre *Streptothrix.* Nous l'appellerons *Streptothrix Maduræ.*

Les rameaux de ce microbe sont très grêles et mesurent 1 μ à 1 μ 5 environ d'épaisseur. A la périphérie des bouquets mycéliens, et dans les points qui n'ont pas été trop dissociés par le frottis, les éléments constituants offrent une disposition manifestement rayonnée, comme dans l'actinomycose. Mais on ne voit pas, comme dans celle-ci, de formes en crosse ou en massue.

Il existe néanmoins fréquemment, soit dans la continuité des filaments, soit à l'une de leurs extrémités, de très petits renflements irréguliers ou en boutons (2 μ environ), tels que ceux qu'on trouve dans les rameaux fructifères des autres espèces de Streptothrix. Parfois ces portions épaissies alternent avec des étranglements, et le rameau peut prendre en même temps un

aspect sinueux. Il est probable que ce sont là simplement des formes d'involution du parasite, acquises pendant son séjour dans les tissus : ainsi que nous le verrons, en effet, on ne retrouve pas, dans les cultures, ces formes irrégulières ou inégalement renflées.

A un fort grossissement et sur un grand nombre de points, le protoplasma du Streptothrix paraît discontinu, condensé en certaines parties des ramuscules, raréfié ou nul en d'autres. Quelques-uns des filaments ont des contours peu visibles et renferment de fines granulations d'inégal volume, formant un pointillé très pâle. Ailleurs, le bâtonnet reste incolore sur une assez longue étendue de son trajet, pour reparaître nettement plus loin. Enfin les filaments sont souvent régulièrement interrompus, et ressemblent ainsi à des chapelets de microcoques dont les éléments seraient anormalement espacés.

Ces divers aspects sont dus à ce que la matière colorante se fixe plus spécialement de place en place, et ils simulent, par leur ensemble, un mycélium avec ses arthrospores. Il ne semble pas cependant que ce soient là des formes durables du parasite, car elles ne présentent aucune dimension fixe et ne sont pas arrondies. D'autre part, cette apparence pseudo-sporulée n'existe que dans les préparations traitées par la méthode de Gram; la coloration intense que donne le liquide de Ziehl, par exemple, teinte, au contraire, uniformément la totalité du protoplasma. On sait, d'ailleurs, que certains végétaux, tels que les Hyphomycètes, montrent fréquemment, dans la continuité de leurs rameaux, des lacunes irrégulières analogues. Mais les filaments du *Streptothrix Maduræ* ne sont pas, comme ces derniers, entourés d'une gaine ni pourvus de cloisons transversales.

b) Cultures[1]. — Pour isoler, à l'état de pureté, le parasite des lésions offertes par le pied du malade, on a, selon les procédés usuels, stérilisé la surface des téguments par des lavages successifs

1. Je dois mentionner, pour mémoire, les tentatives de culture qui ont été faites par Berkeley et par Vandyke Carter; mais elles aboutirent seulement, ainsi que le dit A. Kanthack (*loc. cit.*) « à la production de moisissures sans importance, la méthode d'isolement employée étant par trop primitive et imparfaite ». Lewis et Cunningham (*loc. cit.*) font du reste observer que le champignon de Carter (Chionyphe Carteri), qui avait poussé d'une manière *luxuriante*, « avait été retiré de pièces ayant séjourné dans l'alcool, aussi bien que de tissus qui n'avaient pas été soumis à la même influence, ce qui établit, sans conteste, que cette moisissure n'avait rien de commun avec le parasite réel du Pied de Madura. »
Jusqu'ici, ce microbe n'a donc pas été isolé ni cultivé.

à l'éther, au sublimé acide, à l'alcool absolu, puis à l'eau stérilisée. La surface des petites tumeurs, asséchée à l'aide de papier buvard stérilisé, était ponctionnée avec un bistouri flambé et, par la boutonnière ainsi faite, il était facile d'en aspirer tout le contenu à l'aide d'une pipette suffisamment large.

Nos premiers essais de culture de ce nouveau microbe n'avaient donné que des résultats médiocres. Le Streptothrix se cultivait d'une manière insignifiante dans les milieux habituels aussi bien que dans d'autres milieux plus exceptionnels; liquide de Cohn, eau albumineuse, etc... Quelques-uns des tubes de bouillon donnèrent cependant, au bout de quinze ou vingt jours, une maigre culture formée de très petits grains arrondis et grisâtres. Sous l'influence d'ensemencements successifs, on a fini par obtenir des cultures plus prospères.

Dans le tube de bouillon, qui demeure clair, le parasite se développe actuellement sous formes de boules minuscules grisâtres ou blanchâtres, qui flottent lorsqu'on agite le tube, mais ne tardent pas à se déposer au fond lorsqu'on laisse la culture au repos. Ces petites zooglées sont indépendantes les unes des autres; quelques-unes adhèrent assez fortement aux parois du verre. Le développement du microbe dans le bouillon de bœuf ordinaire reste, malgré tout, assez faible.

Après de nombreux essais, les milieux de culture qui ont paru les plus favorables pour la culture du microbe du Pied de Madura sont les infusions végétales non neutralisées (et par conséquent légèrement acides) de foin ou de paille, ceux-ci étant débarrassés des plantes dites aromatiques qui pourraient s'y trouver. La proportion de foin doit être de 15 grammes pour un litre d'eau.

Le bouillon fait avec une simple infusion de légumes : navets, carottes et surtout pommes de terre (20 grammes pour 1,000 grammes d'eau), filtrée et stérilisée, convient encore très bien à la multiplication du Streptothrix.

Celui-ci prolifère également, mais avec moins de succès, dans l'infusion de levure à 6 pour 100.

Le microbe se développe à la température ordinaire, mais son *optimum* de température est à 37°. Au-dessus de 40°, sa multiplication est nulle.

Dans les divers milieux de culture dont il vient d'être parlé,

le développement du Streptothrix est précoce et luxuriant, surtout si l'on fait l'ensemencement dans un tube large ou dans un flacon d'Erlenmeyer incomplètement rempli, où l'accès de l'air soit facile : la culture part dès le cinquième jour, souvent dès le quatrième. On facilite sa végétation ultérieure si l'on a soin d'agiter quotidiennement le tube de culture.

Alors apparaissent, de plus en plus nombreux, de petits flocons blanc grisâtre, arrondis ou aplatis, dont quelques-uns se fixent à la paroi du récipient. La plupart se déposent au fond. Au bout de vingt à trente jours, ils ont acquis le volume d'un petit pois. Cependant, si leur multiplication a été hâtive, ils restent petits et forment des flocons innombrables et enchevêtrés. Quelques-unes des boules brunissent en leur centre. Celles qui sont restées adhérentes au verre, près de la surface libre du liquide et au contact de l'air, prennent souvent une coloration rose ou rouge après un mois ou deux. La culture peut progresser pendant assez longtemps, mais la couche qu'elle forme au fond du tube dépasse rarement un demi à un centimètre. Le liquide ne se trouble jamais. A la longue, il fonce légèrement en couleur (surtout l'infusion de foin). En outre, il acquiert une faible réaction alcaline, qu'on peut mettre en évidence en additionnant le milieu de culture, au moment de l'ensemencement, de quelques gouttes de teinture de tournesol. Au bout de quelque temps, l'infusion végétale a viré au bleu très pâle.

Très souvent, la surface du liquide finit par se couvrir d'une efflorescence blanche très délicate formée par des spores.

Les cultures ne dégagent pas d'odeur de moisi, ainsi que le font certaines espèces de Streptothrix (E. Almquist, Gasperini, Sauvageau et Radais), entre autres un Streptothrix blanc et un Streptothrix noir que nous avons isolés de l'air d'une salle d'autopsie.

Ensemencé par piqûre dans la gélatine ordinaire, le *Streptothrix Maduræ* y forme, le long du trajet du fil de platine et à la surface de la gélatine, une culture blanche peu abondante. Il se développe beaucoup mieux dans le milieu suivant, neutralisé et stérilisé :

Infusion de foin ou de pomme de terre.	100 c. c.
Gélatine	9 grammes.
Glycérine	4 —
Glycose	4 —

Il ne liquéfie pas la gélatine.

La gélose ordinaire lui convient assez peu; mais si on l'ensemence à la surface de la gélose glyco-glycérinée, on obtient de belles colonies saillantes, arrondies, vernissées, d'un blanc légèrement jaunâtre, qui prennent souvent plus tard une coloration rose ou même rouge vif. Lorsque les colonies sont nombreuses, elles demeurent très petites; si, au contraire, elles sont peu confluentes, elles grossissent plus aisément et quelques-unes peuvent atteindre le volume d'un petit pois. Elles s'affaissent alors en leur centre, s'ombiliquent et ressemblent un peu à des pustules varioliques, la partie centrale, déprimée, restant blanche, le bourrelet et les parties latérales devenant rouges. Lorsqu'elle est ancienne, la culture sur gélose finit par se décolorer et devenir d'un blanc mat.

Les colonies sont très adhérentes au substratum, et de consistance presque cornée.

Le Streptothrix se multiplie assez bien dans le lait stérilisé; il ne le coagule pas, mais le peptonise très lentement.

Son développement est nul dans l'œuf et dans le sérum.

Ensemencé sur la pomme de terre, le microbe ne tarde pas à y former, dès le cinquième jour, et à la température de 37°, de petites éminences incolores ou blanchâtres, qui s'accroissent peu à peu, et offrent ensuite l'aspect de végétations mamelonnées ou mûriformes, parfois grenues quand les colonies sont nombreuses[1]. La pomme de terre est déprimée à l'endroit de la culture, mais elle ne change pas de couleur. Après un mois, on aperçoit à la loupe, en certains points, une teinte rose pâle qui s'accentue de plus en plus (surtout si l'on aère de temps en temps la culture) et devient tantôt rose vif, tantôt orangée ou rouge, parfois d'un beau rouge foncé. (Fig. 1, pl. VII.) La coloration est d'autant plus intense que la pomme de terre est plus acide. Sur certaines pommes de terre, la formation chromogène est nulle.

1. Lorsque les cultures sont arrivées à un développement complet, chaque colonie ou chaque sphère mycélienne est creuse en son centre (nous retrouverons le même aspect du parasite dans les lésions du pied). C'est pour cette raison que les colonies isolées développées sur les milieux solides (gélose, pomme de terre) s'affaissent et s'ombiliquent en leur milieu. En pratiquant, au microtome, des coupes transversales de l'une de ces cultures et de son substratum, après fixation préalable par l'alcool absolu et inclusion dans la paraffine, on obtient des préparations faciles à colorer, et dans lesquelles on voit effectivement que le centre de ces zooglées est vide. Les filaments ne pénètrent qu'à une très faible profondeur dans l'intérieur de la pomme de terre.

Quelques-unes des colonies sont comme saupoudrées d'une fine poussière blanche constituée par des spores.

Dissociée avec le fil de platine, la culture est d'une consistance à la fois dure et friable. Elle est blanchâtre dans sa profondeur.

Le streptothrix peut se cultiver encore sur d'autres légumes tels que le navet, la carotte, le chou, etc... Bien que son développement y soit beaucoup plus maigre que sur la pomme de terre, on peut cependant obtenir, sur la carotte, des cultures assez belles et parfois vivement colorées en rouge.

Ce microbe est aérobie. Les essais de culture que nous avons faits, dans le vide, dans l'acide carbonique et dans le gaz d'éclairage ont entièrement échoué.

c) *Microorganismes pyogènes.* — Il a été dit que certaines des tumeurs du pied du malade s'étaient abcédées et laissaient écouler un pus jaunâtre. Dans ces nodules ainsi suppurants, l'ensemencement a fourni, en même temps que le streptothrix, deux autres microorganismes : les staphylocoques blanc et doré.

Dans l'actinomycose, on trouve souvent aussi, outre l'actinomyces, des microbes pyogènes (Macé).

d) *Morphologie du Streptothrix.* — L'aspect microscopique que présente le parasite du Pied de Madura dans les productions pathologiques, sous la forme des corpuscules caractéristiques qui ont été décrits, se retrouve à peu près intégralement dans les milieux de culture artificiels. Mêmes ramifications, même disposition rayonnée des filaments périphériques. Néanmoins ces filaments ont paru plus grêles dans les cultures, et leur largeur n'excède pas 1 μ environ.

Nous avons parlé de ces séries de renflements irréguliers alternant avec des portions plus étroites et qui se trouvent dans les grumeaux issus du pied du malade. Ces formes n'ont pas été retrouvées dans le microbe ensemencé dans les milieux artificiels. Il est probable que ces renflements trouvés dans les tissus représentent, ainsi que Boström l'admet pour l'actinomycose, un état dégénéré de la membrane du microbe sous l'influence de la réaction de l'organisme envahi.

Par contre, dans les cultures anciennes de deux semaines, l'extrémité des filaments se fragmente souvent en une série de

segments réguliers et rapprochés, ovoïdes, plus larges que le filet mycélien lui-même. Ces filaments constituent des rameaux fructifères semblables à ceux que MM. Sauvageau et Radais ont décrit à propos d'autres espèces de Streptothrix[1].

L'examen des cultures en gouttelette suspendue permet d'observer le mode de formation des ramifications du Streptothrix. On assiste, au bout de deux à trois jours, à la naissance de petits prolongements qui poussent sur les parties latérales d'une branche principale, d'abord semblables à de petits tubercules réfringents, puis de plus en plus allongés, et à peu près perpendiculaires à l'axe du filament générateur. Bientôt les bourgeons secondaires sont devenus eux-mêmes assez longs pour donner naissance à des bourgeons qui se développent de la même façon et s'intriquent avec les filaments voisins. L'aspect général de la petite colonie devient, après six jours, nettement arrondi, et, tandis que la masse centrale est composée d'un chevelu de rameaux indistinctement entremêlés, les branches superficielles sont toutes dirigées excentriquement.

Le parasite se colore très bien par les dérivés basiques d'aniline. Il se teinte plus faiblement par la safranine, l'éosine. Il prend la coloration par la méthode de Gram ou celle de Weigert. L'eau iodée le colore en jaune brun. L'hématoxyline lui communique une teinte violette.

Nous avons laissé dessécher, pendant neuf mois, sur du papier buvard stérilisé, une culture du Streptothrix; une autre culture sur la pomme de terre, ancienne de vingt et un mois, a été reprise au bout de ce temps. Dans les deux cas, le réensemencement a fourni une nouvelle culture normale. Cette longévité du parasite s'explique par la présence de ses spores.

La formation des spores du Streptothrix du *Pied de Madura* se fait surtout, comme celle des autres espèces de Streptothrix saprophytes ou pathogènes, dans les points qui sont en contact avec l'air. C'est principalement dans les cultures en bouillon de foin, laissées dans un endroit tranquille, que la sporulation est la plus fréquente. On peut alors apercevoir une pellicule blanche, ténue, cohérente, flottant à la surface de la culture, non mouillée par elle, et difficile à noyer lorsqu'on agite le flacon. La sporulation se produit encore à la surface des cultures

1. Sauvageau et Radais, *Annales de l'Institut Pasteur*, 25 avril 1892.

sur pomme de terre. Il suffit enfin de déposer, dans l'eau stérilisée, un petit flocon de culture pour voir quelquefois se former ultérieurement, à la surface du liquide, un petit nuage constitué par des *spores*.

La présence de l'oxygène de l'air n'est pas, cependant, nécessaire pour la fructification du parasite. Le dépôt des cultures anciennes dans l'infusion de foin et surtout de pomme de terre renferme ordinairement une quantité abondante de spores.

Recueilli à l'aide d'un fil de platine et déposé sur une gouttelette d'eau distillée où il s'étale immédiatement, le voile formé à la surface des cultures en milieux liquides montre, au microscope, une infinité de petites cellules ovoïdes, très réfringentes, accouplées par deux, trois, ou souvent réunies en amas volumineux. On peut en voir qui sont disposées bout à bout en courtes chaînettes : on croirait avoir affaire à une impureté due à des micrococques. Ce sont les spores du Streptothrix.

Ces spores sont un peu plus larges que le filament mycélien lui-même; leurs dimensions sont de $1 \mu 5$, environ, de largeur et 2μ de longueur. Elles sont brillantes; leurs contours sont nets et accusés, et elles paraissent superposées à une couche de filaments ramifiés très pâles.

A l'inverse des spores des Bactériacées, celles du *Streptothrix Maduræ* se colorent très bien par les couleurs d'aniline ainsi que par la méthode de Gram.

Lorsqu'on ensemence les spores dans un bouillon neuf et qu'on les examine en culture en gouttelette pendante, on les voit s'allonger à l'une de leurs extrémités et former un court bâtonnet à bouts arrondis, qui s'accroît ensuite peu à peu et fournit lui-même des gemmes latérales. Les filaments semblent s'épaissir lorsqu'ils arrivent à la limite de la goutte et au voisinage de l'air.

Ses spores sont tuées par une température de 85° prolongée pendant trois minutes. Elles résistent à 75° pendant cinq minutes. Les cultures non sporulées sont détruites à 60° au bout de trois à cinq minutes.

e) *Inoculations*. — Plusieurs animaux : lapins, cobayes, souris, chat, ont été inoculés à différentes reprises, soit avec les grains parasitaires extraits du pied du malade, soit avec les cul-

tures elles-mêmes. Les inoculations variées et faites même à doses massives n'ont jamais amené qu'un nodule local lorsque l'injection était pratiquée sous la peau : la petite tumeur progresse faiblement pendant un mois, puis finit par se résorber.

M. Nocard a essayé les mêmes inoculations avec ces cultures et a bien voulu nous informer que ses tentatives d'injections sous-cutanées, intraveineuses ou intrapéritonéales au cobaye, au lapin, au pigeon, à la poule, au chien, au mouton, sont toujours restées sans résultat. Il n'a pas trouvé de traces du parasite chez quelques animaux sacrifiés plus ou moins longtemps après l'inoculation.

Le *Streptothrix Maduræ* n'est donc pas pathogène pour les animaux.

f) Anatomie pathologique. — Pour étudier les lésions histologiques de la maladie de Madura à ses diverses périodes d'évolution, on a excisé des fragments cutanés assez volumineux, de un centimètre à un centimètre et demi de diamètre, au niveau des points où les nodules étaient encore jeunes, durs et douloureux, ainsi que dans les parties où les petites tumeurs étaient en état de ramollissement.

Cet examen n'a pas été sans offrir quelques difficultés pratiques à cause de la mobilité des grains parasitaires inclus dans les nodules. Par suite de l'action des réactifs durcissants, ces grains se rétractent encore davantage dans le tissu friable au milieu duquel ils sont renfermés, et s'échappent des tissus lorsqu'on en fait la coupe ou la coloration.

Pour obvier autant que possible à cet inconvénient, les fragments biopsiés ont été soumis à un durcissement progressif par l'action successive de l'alcool à 60°, puis à 80°, 90°, enfin de l'alcool absolu. Après inclusion dans la paraffine, les pièces ont été débitées en coupes minces au microtome, et il a été nécessaire de coller les coupes, sur les lames porte-objet, à l'aide de l'eau gommeuse, suivant le procédé que recommandent de Nabias et Sabrazès [1]. Au bout de vingt-quatre heures, les coupes ainsi fixées sont débarrassées de leur paraffine par lavage à l'éther, puis colorées d'après les procédés usuels. La double coloration par le carmin lithiné de Orth et par le violet de

1. De Nabias et Sabrazès, *Archives cliniques de Bordeaux*, avril 1893.

gentiane selon la méthode de Gram, est celle qui a donné les préparations les plus favorables.

1° Sur les coupes ainsi traitées et étudiées à un faible grossissement (Oc. 1, Obj. O, Vér.), les tissus malades tranchent sur les parties saines de la peau et du derme par une coloration moins accusée. L'ensemble de la zone dégénérée est de teinte rose jaunâtre et forme un nodule arrondi, ou mieux, un *volumineux tubercule* de structure à peu près uniforme, mais parsemé d'assez nombreux capillaires dont on voit la coupe horizontale ou transversale.

Au centre de ce nodule est le bloc mycélien (fig. 2, pl. VII), vivement coloré en violet, et dont les contours sinueux et souvent réguliers constituent un feutrage épais dont l'ensemble simule un peu une couronne. Le centre de la masse bactérienne est presque entièrement dépourvu de filaments.

A côté ou en un point variable de cette colonie principale existent souvent d'autres colonies secondaires.

Les limites du nodule et celles des parties saines sont assez visibles au même grossissement, bien qu'il n'existe aucune membrane ni même aucune condensation particulière des tissus qui les circonscrive. Deux ou plusieurs de ces nodules peuvent se confondre ou se juxtaposer.

Dans les tumeurs arrivées à la période de ramollissement, les préparations, observées à un grossissement moyen, montrent un soulèvement manifeste de l'épiderme et de ce qui reste de la couche de Malpighi. En ces points, les lames cornées les plus superficielles de l'épiderme ont conservé à peu près leur épaisseur normale; mais la couche ondulée et striée sous-jacente est considérablement amincie et peut même avoir presque entièrement disparu.

Le *stratum granulosum*, très atrophié aussi, n'est plus représenté que par quelques éléments cellulaires infiltrés de quelques gouttelettes d'éléidine. Le corps muqueux participe à cette atrophie générale : son épaisseur normale est réduite au quart, au cinquième, quelquefois au dixième dans les points où la formation bulleuse du nodule est la plus avancée. La couche des cellules pigmentées, normalement très abondante chez ce sujet, est également à peine apparente.

Il n'existe aucun phénomène d'irritation des cellules du corps

muqueux; leurs noyaux ne sont pas multipliés; pas d'infiltration leucocytique.

Au-dessous de l'épiderme, les saillies papillaires sont effacées. Le chorion, lui-même, est réduit à une mince bande conjonctive. Dans certaines préparations il a entièrement disparu. Dès lors, la couche épidermique et le corps muqueux de Malpighi, fortement atrophiés l'un et l'autre, reposent directement sur la néoformation pathologique.

A la limite latérale de ce nodule, la peau recouvre cependant peu à peu ses caractères normaux; les papilles se dessinent, de moins en moins élargies, et l'on peut même voir, sur les côtés du tubercule, les prolongements hypertrophiés du corps muqueux qui descendent assez loin dans la profondeur des tissus et encadrent partiellement la tumeur

Lorsque les foyers de dégénérescence sont plus profonds, la peau est, au contraire, intacte, et leur présence se traduit simplement par un faible effacement des papilles du derme et par un aplatissement plus ou moins marqué des cellules profondes du corps muqueux.

Au voisinage immédiat des nodules parasitaires, le chorion est infiltré de petites cellules arrondies; quelques-unes de ses artérioles présentent un épaississement de leur tunique externe et, parfois aussi, un peu d'endartérite. Les glandes sudoripares sont à peu près saines; leurs tubes sécréteurs sont cependant obstrués parfois par des cellules desquamées, et, par suite du gonflement des tissus, les spires des canalicules excréteurs de ces glandes sont, dans leur trajet intradermique, beaucoup plus espacées qu'à l'état normal.

2° Il nous faut maintenant étudier la structure des nodules eux-mêmes. Comme il a été dit, on peut les comparer à de véritables tubercules de dimensions volumineuses.

Chaque nodule est constitué, au centre, par l'amas mycélien du Streptothrix. Autour de celui-ci, le microscope montre un groupement énorme de cellules petites, arrondies, dont le noyau, isolé ou en voie de division, est bien coloré par le carmin et remplit la presque totalité de la cellule.

Ces éléments embryonnaires se touchent, pour ainsi dire, sans être séparés par un ciment intercellulaire : on dirait des cellules du pus, et l'on s'explique ainsi la friabilité

extrême que présentent les nodules en leur partie centrale.

Parmi ces petites cellules arrondies, on en trouve quelques-unes beaucoup plus rares, allongées, fusiformes, ou à contours sinueux, d'autres plus larges, plates, pourvues d'un ou de deux noyaux, et à protoplasma très pâle.

A mesure qu'on s'éloigne du centre du nodule, on voit les cellules devenir à la fois plus espacées et plus volumineuses. Elles sont logées dans une substance fondamentale réticulée dont les mailles sont elles-mêmes comme élargies et remplies d'une sorte d'exsudat, probablement œdémateux, de teinte rose pâle et d'apparence vaguement fibrillaire. Les grosses cellules dominent : mais on rencontre aussi, outre des cellules embryonnaires, d'autres éléments très petits, presque entièrement remplis par leur noyau.

Les véritables *cellules géantes* sont très rares ; nous en avons cependant trouvé dans quelques coupes, où elles présentaient des contours sinueux, un protoplasma amorphe ou finement grenu renfermant 6, 8, 10 noyaux volumineux, disposés près de la périphérie de la cellule géante.

Dans le tubercule lui-même sont souvent de petits îlots de jeunes cellules confluentes. L'infiltration embryonnaire se poursuit, du reste, presque toujours en dehors des limites de la tumeur, franchissant les travées cellulaires du derme et dissociant même ses faisceaux sur une petite profondeur. On retrouve ces cellules autour des capillaires et des tubes des glandes sudoripares.

Dans les nombreuses coupes qui ont été examinées, il n'a jamais été observé de zone vitrifiée ou calcaire telle qu'on en rencontre si fréquemment dans les lésions de l'actinomycose, ni de parties atteintes de dégénérescence caséeuse. Par contre, les foyers morbides sont sillonnés par de nombreux capillaires, que l'on aperçoit bien surtout dans les préparations colorées à l'hématoxyline ou au carmin aluné. Ces petits vaisseaux sont, pour la plupart, pourvus de parois embryonnaires, et peuvent se rompre en laissant, dans le nodule, des *foyers d'infiltration hémorragique* souvent très étendus.

Quelques-uns de ces vaisseaux offrent une paroi conjonctive mince et sont tapissés à leur intérieur d'un endothélium à cellules allongées, plates, mais dont les noyaux font saillie dans la

lumière du vaisseau. Bien que le calibre interne de ces capillaires soit très petit, ils ne sont, cependant, nullement oblitérés.

Cette richesse vasculaire des nodules explique l'abondance de l'hémorragie diffuse qui succède, ainsi qu'on l'a déjà signalé, à l'incision des tumeurs du pied. Avec la structure embryonnaire de la plupart des vaisseaux, elle permet ainsi de comprendre le mécanisme du ramollissement des nodosités par un épanchement sanguin qui dissocie les éléments du tubercule, le remplit et forme un petit hématome mou et fluctuant dans lequel nagent les corpuscules du streptothrix.

A un grossissement fort (Oc. I, Obj. à imm. 1/16. Vér.), l'examen du tissu qui confine à la périphérie du parasite révèle une disposition histologique assez intéressante. Ce tissu présente manifestement des *striations* dont la direction est uniformément excentrique ou radiée. Ailleurs ces striations semblent s'agglomérer en *faisceaux fusiformes* vaguement dessinés. Cette couche striée a une épaisseur approximative de 15 μ à 25 μ, et elle est parsemée de très nombreuses cellules leucocytaires qui sont, elles-mêmes, étagées suivant une direction à peu près parallèle aux stries. Les petites cellules sont plus abondantes à la périphérie de cette couche, et elles sont vivement colorées par le carmin, tandis que le fuseau et les stries sont incolores ou d'un gris rosé.

Dans quelques préparations, la couche radiée est adhérente à la périphérie de l'amas mycélien. Très souvent cependant elle s'en détache par le fait du simple étalement de la coupe, et l'on peut voir qu'elle n'est pas exactement appliquée sur la zooglée et qu'elle n'en simule pas le prolongement, mais qu'elle en est presque toujours séparée par une étroite bande de structure incertaine, amorphe ou un peu granuleuse, mal colorée.

La conformation histologique qui vient d'être décrite est, semble-t-il, d'interprétation assez obscure. On peut évidemment, par analogie avec ce qu'on observe dans les lésions de l'actinomycose, voir, dans ces sortes de fuseaux et dans ces striations, des ébauches de crosses ou de renflements piriformes. Mais il est à noter qu'ils sont, ici, incolores, et que l'aspect du parasite lui-même diffère notablement des massues nettement colorées qui caractérisent l'actinomycose dans les productions pathologiques.

L'apparence striée peut s'expliquer avec beaucoup de vraisemblance par la dégénérescence des nombreux filaments

périphériques du Streptothrix sur lesquels le violet de gentiane n'a, dès lors, plus de prise. On a vu, dans le courant de ce travail, que dans les milieux de culture artificiels, les rameaux affectent, à la périphérie des sphères mycéliennes, une direction excentrique. Il en est de même dans les tissus du pied. Mais, envahie par les cellules immigrées et soumise à leur action, la périphérie du Streptothrix est partiellement ou totalement dégénérée, et ces formes d'involution ne se laissent plus colorer. Comme ils sont fort nombreux, un peu réfringents, ces filaments communiquent au tissu l'apparence striée dont il vient d'être parlé.

Du reste, lorsqu'ou soumet les préparations à une coloration plus énergique, par la solution anilinée de violet de gentiane, en chauffant légèrement ou en prolongeant son contact avant de décolorer ensuite par le procédé de Gram, on réussit souvent à déceler, au milieu de la couche radiée, des rameaux du streptothrix qui ont résisté à la destruction et se sont laissés colorer plus ou moins bien par le violet. Ces vestiges du parasite sont également dirigés vers la périphérie, seulement ils sont irrégulièrement fragmentés en débris dont les uns sont très petits, les autres plus allongés, renflés à une extrémité comme des spermatozoïdes ou de très fines massues. (Fig. 3, pl. VII.)

3° L'aspect du Streptothrix lui-même, logé au centre du nodule, est tel qu'il a été décrit à propos de l'examen microscopique des corpuscules extraits du pied du malade. Il est donc inutile de revenir sur sa description. Notons cependant que lorsque les colonies examinées dans les coupes sont très volumineuses et par conséquent anciennes, elles prennent moins bien les couleurs d'aniline, alors que la même préparation peut en renfermer d'autres plus petites et plus récentes, qui sont normalement teintées.

III

DÉTERMINATION DU PARASITE

Les caractères morphologiques qui viennent d'être assignés au microbe du Pied de Madura, l'absence de gaine autour du filament, l'absence, aussi, de cloisonnements transversaux, ses petites dimensions, enfin et surtout les ramifications vraies qu'il

présente, ne laissent aucun doute sur le genre dans lequel on doit le classer : c'est, comme il a été dit, un *Streptothrix*. Si l'on admet, avec MM. Sauvageau et Radais, dont le mémoire a paru en 1892 dans ces *Annales*[1], que les Streptothrix doivent être, avec les Cladothrix (filaments à fausses ramifications), distraits des Bactériacées pour être réunis aux Mucédinées sous la rubrique commune d'Oospora (Walroth), le *Streptothrix Maduræ* doit évidemment rentrer dans ce même genre.

Ce nouveau parasite se rapporte-t-il à l'une des espèces décrites jusqu'ici ?

M. Nocard, dans la maladie du Farcin du bœuf[2]; Almquist, dans un cas de méningite[3]; Eppinger, dans un abcès ancien du cerveau à contenu gélatineux[4], etc., ont pu isoler des parasites sous forme de filament, ramifiés appartenant au groupe Streptothrix. Mais les réactions de culture offertes par ces divers microbes les différencient suffisamment soit entre eux, soit du parasite du Pied de Madura. Le microbe du Farcin du bœuf, en particulier, se développe rapidement dans le bouillon de bœuf peptonisé, tandis que sa multiplication est presque nulle dans l'infusion de foin. C'est l'inverse pour le microbe du Pied de Madura. Les caractères des cultures sur pomme de terre, sur gélose, ne présentent davantage aucune analogie. Enfin le microbe du Farcin du bœuf est inoculable au cobaye, celui du Pied de Madura ne l'est pas.

Gasperini[5], Doria[6], ont trouvé dans l'air certaines espèces appartenant au genre Streptothrix, et qui possèdent également la propriété de devenir rouges sur divers milieux de culture. Mais ces espèces sont des saprophytes. Il est possible, sans doute, que le *Streptothrix Maduræ* soit primitivement un parasite banal implanté accidentellement dans l'organisme humain, et ayant pénétré à la faveur d'une excoriation du pied chez les Indiens

1. Sauvageau et Radais, *Annales de l'Institut Pasteur*, 25 avril 1892.

2. Nocard, Note sur la maladie des bœufs de la Guadeloupe connue sous le nom de farcin. (*Annales de l'Institut Pasteur*. T II, 1888, p. 293.)

3. Almquist, Untersuchungen uber einige Bacteriengattungen mit Mycelium. (*Zeitschr. fur Hyg*, VII, 1890, p. 189.)

4. Eppinger, Ueber eine neue path. Cladothrix und eine durch sie hervorgerufene Pseudotuberculosis (cladothrichica). (*Wiener Klin. Wochenschr.*, 1890, nº 17.)

5. Gasperini, *Soc. Toscana di Scienze natur.* Pise, 1891, p. 297.

6. Doria. *Annali dell' Instit. d'Igiene sperim. dell' Univers. di Roma*. I, 1892. p. 42. Cité par MM. Sauvageau et Radais.

qui marchent sans chaussures; mais les éléments dont nous disposons ne sont pas assez nombreux pour l'affirmer.

C'est avec l'actinomycose que l'on a pu confondre aisément à la fois le parasite du Pied de Madura et la lésion, pourtant si spéciale dans ses caractères et dans sa localisation, que détermine ce dernier microbe. A s'en tenir à l'aspect macroscopique des petits grumeaux isolés des parties malades et aux caractères microscopiques qu'ils présentent, on pourrait, en effet, croire, à première vue, qu'il s'agit d'une manifestation de l'actinomycose. Telle est, du moins, l'interprétation unanime fournie par les médecins anglais qui ont étudié la maladie.

Les cultures pouvaient seules, en effet, permettre de faire la détermination exacte de ce parasite. Or, jusqu'ici, elles n'avaient pas été réalisées avec succès, sans doute à cause de la difficulté du développement du microbe sur les milieux usuels.

Dans le travail le plus récent qui ait paru sur cette matière, A. Kanthack[1], se fondant sur le seul résultat de l'examen histologique, est très affirmatif et identifie sans réserve le microbe du Pied de Madura avec celui de l'actinomycose.

Boyce et Surveyor ont présenté à la *Société pathologique de Londres* des coupes histologiques d'un cas de Pied de Madura et concluent que son parasite et l'actinomyces sont un seul et même microorganisme.

Hewlett[2], dans un mémoire qu'il intitule : *Sur l'actinomycose du pied, appelée communément Pied de Madura,* trouva, outre les lésions cutanées, un ramollissement des os qui étaient envahis, parsemés de cavités dont les unes étaient remplies de pus, les autres renfermaient de petites granulations jaunâtres formées d'une agglomération de filaments. On retrouve là, selon Hewlett, tous les caractères de l'actinomycose humaine. Chez le bœuf, les filaments sont moins denses et moins nombreux. Pour lui, toutes ces affections relèvent d'une origine identique. Faisant allusion à un mémoire de Bassini[3] qui observa, dans un cas de

1. A. Kanthack, *Pathological Society of London,* 19 janvier 1892.
Id., Madura disease. Mycetoma and actinomycosis. (*Journ. of Pathol. and Bacter.*, octobre 1892.)

2. Hewlett, On actinomycosis of the foot, commonly known as « Madura, foot ». (*The Lancet,* 2 juill. 1892.)

3. Bassini, *Archiv. per le Scienze med.*, XII, n° 15, p. 309. Pour cet historique, *ref. Bulletin médical,* 1892, n° du 6 juillet, p. 1050.

Pied de Madura, un semblable mycelium, Hewlett pense que la description de cet auteur rappelle celle de l'actinomycose.

Cette question de l'identité ou de la différence des deux parasites de l'actinomycose et de la maladie de Madura mérite de nous arrêter un peu; elle présente, en effet, une importance non seulement théorique, mais encore pratique, puisque, selon la nature du parasite, elle sera ou non influencée heureusement par l'usage interne de l'iodure de potassium, dont Thomassen, Nocard, Meunier, Netter, ont reconnu les propriétés thérapeutiques à l'égard de l'actinomycose.

Or, nous ne saurions souscrire à l'opinion qui admet l'identité de ces deux microorganismes. Le seul aspect morphologique des deux microbes dans les tissus est, en effet, un facteur d'appréciation insuffisant pour les assimiler. On n'est évidemment pas plus autorisé à le faire qu'on ne le serait à identifier deux micrococques ou deux bacilles, offrant, à l'examen microscopique, des caractères et des dimensions semblables. Les cultures en des milieux variés, les inoculations, etc., donnent des résultats entièrement différents pour l'un et l'autre parasite.

D'ailleurs, les auteurs précédents ne se sont-ils pas exagéré les analogies que présentent, même au microscope, l'actinomycose et le Streptothrix du Pied de Madura? Il suffira d'examiner, dans la planche qui reproduit les préparations des tumeurs de notre malade, l'aspect qu'offre le Streptothrix pour voir qu'il ne rappelle qu'assez peu celui des crosses radiées, des renflements piriformes et digités de l'actinomycose. Ces derniers sont incomparablement plus épais, plus massifs, au point d'avoir été considérés comme des gonidies. Nul ne songerait à voir de semblables formes dans le Pied de Madura.

La marche clinique elle-même des deux maladies est-elle semblable? L'actinomycose peut siéger en tous les points du corps, mais de préférence dans la région sous-maxillaire, les poumons ou la peau. Elle aboutit à une suppuration profuse, parfois intarissable, contenant des grains soufrés. La marche est rapide. Elle tend à fuser dans les régions voisines, le cou, la colonne vertébrale, le médiastin, l'abdomen. Enfin, elle est fréquente en Europe et s'observe non seulement chez l'homme, mais encore et très communément chez les bovidés.

Le fongus de Madura est surtout une maladie de l'Inde.

L'affection ne se développe qu'au pied, très exceptionnellement aux mains, et elle s'y limite. Les tissus de la jambe, même les ganglions du creux poplité et de l'aine sont toujours respectés, La marche de la maladie est fort lente : le pied du malade qui fait l'objet de ce travail a commencé à grossir il y a douze ans au moins, et l'affection ne paraît point devoir se terminer de sitôt par la mort, à moins de complication intercurrente. La forme clinique dite *mélanique* de la maladie de Madura est également lente, torpide, et les grains noirs qu'on y observe ne rappellent pas la couleur soufrée des grains d'actinomycose.

Nous ajouterons enfin que, contrairement au résultat obtenu dans l'actinomycose, le traitement ioduré n'a pas réussi chez notre malade. Ce dernier a été soumis, par M. le Dr Gémy, à des doses prolongées et élevées d'iodure de potassium, sans aucune amélioration de son état.

Si nous passons maintenant aux réactions de culture proprement dites que présentent ces deux parasites, nous voyons que leurs différences sont tout aussi accusées.

Les deux microbes — *Streptothrix Maduræ* et actinomyces — ont été ensemencés parallèlement dans les mêmes milieux de culture (bouillon de bœuf peptonisé, infusion de foin, pomme de terre, gélose, etc.) et soumis aux mêmes conditions de température. L'échantillon d'actinomycose qui a servi pour cette étude provient d'une culture fournie par l'Institut Pasteur et transmise par le Laboratoire de Bactériologie du Val-de-Grâce.

Les différences fondamentales qui séparent les caractères des deux microorganismes dans les cultures sont résumées dans le tableau qui suit. Nous négligeons, à dessein, de relever quelques autres caractères différentiels de valeur très secondaire, qui n'ajouteraient rien à la démonstration.

Nº D'ORDRE	CULTURES OU INOCULATIONS	*ACTINOMYCES*	*STREPT. MADURÆ.*
1	Bouillon de bœuf peptonisé	Culture abondante.	Culture médiocre.
2	Infusion stérilisée de foin ou de paille (15 gr. p. 1,000) ..	Développement nul.	Milieu nutritif d'élection. Culture précoce (4e jour) et abondante.
3	Gélatine peptone ordinaire	Liquéfie.	Ne liquéfie pas.
4	Gélatine à l'infusion de foin.	Culture blanchâtre, très faible.	Développement plus rapide. La colonie devient rose ou rouge à la surface.
5	Gélose glycérinée	Taches d'abord blanches, puis grisâtres. Plissées.	Colonies d'abord blanches, puis roses ou rouges. Ombiliquées.
6	Pomme de terre.	Colonies denses, mamelonnées, jaunes et blanches, cerclées de noir. Pomme de terre brunit.	Belle culture rose, rouge vif ou rouge noir, ne brunit pas le substratum.
7	Chou, navet, carotte	Ne s'y cultive pas.	S'y cultive.
8	Sérum.........	S'y développe.	Ne s'y développe pas.
9	Œuf...........	S'y développe.	Ne s'y développe pas.
10	Culture dans le vide	Anaérobie facultatif.	Ne pousse pas dans le vide.
11	Inoculations ...	Inoculable au lapin, au cobaye, au veau, à la génisse.	N'est inoculable à aucun animal.

En résumé, les analogies qui existent entre le Streptothrix du Pied de Madura et celui de l'actinomycose résultent de ce fait que les deux microorganismes pathogènes appartiennent à un genre botanique commun. Mais les réactions morbides qu'ils provoquent chez l'homme; les résultats différents qu'entraîne le traitement ioduré dans l'une et l'autre maladie; leur aspect morphologique dans les tissus eux-mêmes; les caractères respectifs de leurs cultures, les conséquences de leur inoculation, rien, en un mot, ne semble autoriser à les identifier.

Peut-on admettre que la forme *noire* de la maladie, plus fré-

quemment observée que la forme clinique dite *pâle*, répond à une variété différente d'un même microbe? Le fait est très possible, mais nous ne pourrions évidemment l'affirmer, n'ayant eu l'occasion d'étudier que la deuxième forme de la maladie de Madura.

EXPLICATION DES GRAVURES

Fig. 1. — Culture du *Streptothrix Maduræ* sur la pomme de terre.

Fig. 2. — Lésion vue à un faible grossissement. Au centre, amas parasitaire (*a*) entouré d'innombrables cellules embryonnaires (*b*, *b*). Foyer d'infiltration hémorragique (*c*) au milieu du nodule pathologique.

Fig. 3. — Streptothrix (*a*) vu, dans les tissus, à un fort grossissement. Direction excentrique des filaments périphériques (*a*), qui deviennent plus rares au voisinage des cellules rondes; — (*b*), couche striée qui entoure l'amas mycélien. Au milieu de cette couche sont quelques rameaux encore colorés du Streptothrix et dont la plupart offrent des formes d'involution.

CONTRIBUTION

A L'ÉTUDE DES MALADIES PROFESSIONNELLES

PANARIS DES PÊCHEURS ET MICROBE ROUGE DE LA SARDINE

PAR LE DOCTEUR DU BOIS SAINT-SÉVRIN,

Médecin de 1re classe de la marine.

I

Le panaris, dans la pratique courante, est une affection banale, caractérisée par une suppuration locale des tissus des doigts, consécutive à une lésion quelquefois insignifiante de la peau.

On n'a pas encore déterminé quel est l'agent qui cause cette suppuration, mais il est permis de supposer *a priori* que les divers microbes pyogènes connus peuvent la provoquer ; et en fait, en ensemençant le pus de panaris vulgaires, les microbes que j'ai rencontrés sont le *staphylococcus pyogenes albus*, et le *staphylococcus pyogenes aureus*.

Dans les stations de pêche, Terre-Neuve, Islande, mer du Nord, le panaris atteint les pêcheurs avec une telle fréquence, qu'il a été de tout temps considéré par les médecins de la marine comme une maladie professionnelle. Fonssagrives l'appelle « le fléau des grandes pêches ».

Mais les panaris ne se montrent pas avec une égale fréquence dans toutes les stations. Ils sont plus nombreux dans les lieux de pêche où la ligne est en usage, et surtout quand les lignes sont amorcées avec des poissons plus ou moins avariés.

D'un autre côté, on a signalé le pouvoir pyogène de quelques microbes de la putréfaction du poisson.

L'injection sous-cutanée de culture du *proteus vulgaris* ou du *proteus mirabilis* détermine des suppurations locales quelquefois très étendues.

L'injection de ces microbes n'est même pas nécessaire pour causer ces accidents; il suffit d'injecter le liquide de culture filtré sur porcelaine, par conséquent privé de microbes et ne contenant plus que les produits de ces microbes [1]. D'après Tito Carbone, ces produits contiendraient de la choline, de l'éthylènediamine, de la gadinine, de la triméthylamine [2].

Rapprochant ces faits, on est conduit à se demander si, en dehors des microbes ordinaires de la suppuration, les microbes de la putréfaction qui pullulent dans le milieu où vivent les pêcheurs, ne joueraient pas un rôle actif dans les nombreux panaris des pêcheurs.

Dans cet ordre d'idées, les faits suivants me paraissent avoir la valeur d'une expérience.

II

Au mois de juillet 1893, le gérant d'une usine pour la préparation des sardines à l'huile, s'aperçut, avant de fermer ses boîtes, que les sardines formant la couche supérieure de quelques-unes d'entre elles avaient pris une teinte rouge vif. Abandonnées à l'air sans être soudées, ces boîtes exhalaient une odeur infecte.

C'était la première fois qu'un fait semblable se produisait; aussi, justement soucieux, le gérant chercha à s'éclairer sur les causes de ce phénomène et sur les moyens d'y remédier.

La personne à laquelle il s'adressa me fit parvenir une boîte en me priant d'en faire l'analyse bactériologique.

La boîte était soudée. A l'ouverture, les sardines présentaient une légère teinte rose, carminée, assez uniformément répandue sur les écailles.

Aucune mauvaise odeur. L'examen microscopique révélait la

1. Macé, *Traité de bactériologie.* (Bacillus Proteus.)
2. Macé, *L. c.*

présence, en grande abondance, d'un très petit cocco-bacille à éléments réunis deux à deux, immobiles.

Les essais de culture furent négatifs. Dès lors il était évident que la contamination était antérieure à la fermeture de la boîte, et à son passage à la cuisson.

Dans le but de rechercher la provenance du microbe chromogène, et de l'obtenir à l'état vivant, je demandai et obtins gracieusement de faire quelques recherches dans l'usine où le fait s'était produit

La provenance du microbe et le moment où les boîtes avaient été contaminées furent vite déterminées.

Les sardines tranchées, séchées, sont passées à l'huile bouillante, mises à égoutter à l'air, et rangées dans les boîtes pleines d'huile. En raison de l'abondance de la pêche cette année, un certain nombre de boîtes pleines étaient restées plusieurs jours exposées à l'air avant d'être soudées et cuites au bain-marie. C'est alors que, recevant les germes de l'air, elles avaient présenté cette couleur rouge et cette odeur caractéristiques.

La cuisson au bain-marie, après soudure, avait stérilisé la boîte, détruit l'odeur, mais avait laissé subsister les cadavres des microbes et leur couleur spéciale.

L'agent microbien devait donc être un germe de l'air, qui trouvait dans ce milieu huileux et albuminoïde un terrain à sa convenance, et sans doute exalté par suite des températures très élevées du mois de juillet en 1893.

Deux boîtes de Pétri à la gélatine nutritive furent ouvertes pendant dix minutes, et donnèrent les jours suivants une quantité innombrable de colonies. Deux étaient légèrement colorées, l'une en rose, l'autre en orangé, mais aucune d'elles ne reproduisit le microbe dont la présence avait été constatée dans la boîte de sardines.

Cependant, deux faits particuliers avaient attiré mon attention pendant cette visite rapide :

1° L'odeur infecte de triméthylamine répandue dans l'usine, odeur identique à celle qu'exhalent les chauffauds[1] de Terre-Neuve ;

1. L'expression de « chauffaud » à Terre-Neuve, désigne les établissements à terre, dans lesquels on prépare la morue.

2° Bien que d'ordinaire les soudeurs qui procèdent à la fermeture des boîtes de sardines, maniant de minces feuilles de fer-blanc aux bords tranchants, aient, par ce fait, de nombreuses écorchures aux doigts et soient ainsi exposés à contracter des panaris, cette affection est très rare chez eux. Ici, sur dix soudeurs qui avaient procédé à la fermeture des boîtes, sept avaient eu un ou plusieurs panaris.

Cette petite épidémie de panaris, coïncidant avec l'apparition du rouge de la sardine, méritait d'être étudiée.

Parmi les soudeurs atteints, l'un était porteur d'un panaris de l'index droit, intéressant les tissus de la pulpe de la troisième phalange, ouvert spontanément, et en pleine suppuration.

Un fil de platine flambé, plongé dans la pulpe de l'index, servit à ensemencer un tube de bouillon et un tube de gélatine.

Dès les premières heures suivantes, le bouillon mis à l'étuve à 37° devient trouble, blanchâtre, et donne une vive effervescence. Les jours suivants, il se forme un voile épais bleuâtre.

Le tube de gélatine, abandonné à la température ordinaire, présente des bulles en forme de lentilles : il se liquéfie rapidement dans toute l'étendue de la piqûre, devient trouble et donne un voile épais. Le quatrième jour, ce voile présente une teinte irisée, très légèrement rosée sur les bords.

Immédiatement la culture en gélatine sert à ensemencer trois tubes de pommes de terre, et trois tubes de sardines à l'huile, stérilisés à l'autoclave. Mis à l'étuve à 37°, ces six tubes donnent en quelques heures une abondante culture d'un rouge vif, carminé, reproduisant exactement la teinte des boîtes de sardines contaminées, exhalant une odeur infecte de triméthylamine, et donnant, à l'examen microscopique, le même très petit cocco-bacille dont la présence avait été constatée dans la première boîte.

Dès lors, j'étais en possession du microbe chromogène cherché, et en plus, de ce fait qu'il existait dans le panaris des soudeurs.

III

Microbe rouge de la sardine. — Isolé à l'état de culture pure par la méthode de Koch (pommes de terres en cloches) et par la

méthode des boîtes de Pétri, ce microbe présente les caractères suivants :

C'est un cocco-bacille très mobile, dont les éléments réunis deux à deux sont à peine plus longs que larges, et mesurent de 0,5 à 0,6 μ. Quelquefois on les trouve réunis par quatre, et, dans le bouillon, il donne même de longs filaments en forme de vibrions.

Prenant facilement toutes les couleurs d'aniline, il les perd aussi facilement, et ne prend pas le Gram.

La culture sur plaques donne de petits points gris jaunâtre. Après quarante-huit heures, les colonies, formées de rayons enchevêtrés, sont entourées d'une zone de liquéfaction manifeste, et commencent à devenir roses au centre. Les jours suivants l'accroissement est rapide, et la liquéfaction gagne toute la boîte qui devient rose carminé. Si l'on essaie de prélever une colonie en la piquant avec un fil de platine, elle adhère au fil, et s'étire tout entière en un long filament.

Une colonie de quarante-huit heures portée sur lamelle et cultivée en cellule, présente de très petits points couleur rubis régulièrement arrondis et qui grossissent rapidement les jours suivants jusqu'à atteindre 4 et 5 μ. Ils sont alors d'une teinte rose uniforme avec un point plus foncé à l'intérieur. Le plus souvent on les trouve isolés, quelquefois deux à deux et alors généralement de volume inégal. (Fig. 4, pl. VII.)

Ces corps ne constituent pas une impureté. On les retrouve dans toutes les cultures sur lamelle. Il est impossible de les isoler et de les colorer. A la longue les plus volumineux prennent une forme irrégulière et disparaissent quand on les traite par l'acide azotique. Ce serait donc tout simplement des amas de matière colorante et des cristaux. Il semble que la matière colorante s'accumule autour du microbe qui la sécrète, retenue par la gangue visqueuse de ce microbe, et se présente sous la forme d'un petit globe adhérent à la bactérie.

Cependant M. Metchnikoff, qui a bien voulu examiner mes préparations, considère les petits points rouges qui apparaissent dans les cultures sur lamelles comme représentant des formes d'involution analogues aux corps ronds que l'on trouve dans les cultures du vibrion cholérique.

En piqûre dans la gélatine, il se forme très vite un enton-

noir de liquéfaction, déjà visible après quelques heures en été. Les jours suivants, la liquéfaction gagne en profondeur et donne un liquide clair visqueux. La surface se recouvre d'une *mère* formée de flocons grisâtres. Après quarante-huit heures, la teinte rouge apparaît à la surface, puis des flocons rouges tombent au fond, et le liquide se teinte légèrement en rose dans les couches supérieures. La culture adhère comme une gelée au fil de platine et s'étire en filament.

Dans le bouillon mis à l'étuve à 37°, le trouble est manifeste en un temps très court. Après vingt-quatre heures on trouve un voile épais blanchâtre, visqueux, adhérant aux bords du tube et présentant des reflets bleuâtres et verdâtres. Vers le quatrième jour, le voile présente une teinte rouge rappelant celle de la solution aqueuse d'éosine. Les flocons tombent ensuite au fond du tube, où s'accumule un sédiment presque violet. Le liquide se colore en rose et prend un aspect sirupeux. Dans les vieilles cultures, la teinte du bouillon devient brune.

Sur gélose, les cultures ont un aspect terne, blanchâtre. A la température ordinaire comme à l'étuve à 37°, elles se colorent quelquefois en rose pâle, mais d'une façon irrégulière. Quelques-unes cependant donnent quelques points presque rouges.

La pomme de terre est un très bon milieu de culture. A l'étuve à 37° ou 39°, la teinte rouge est manifeste en huit heures ; elle va en s'accentuant pendant quarante-huit heures ; après ce temps, quelques points sont d'un rouge vif à reflets verts comme les couleurs d'aniline. En vieillissant, d'autres prennent une teinte pourpre foncé, presque violette. A la température ordinaire, la culture a d'abord un aspect blanc muqueux, elle rougit à la longue. (Fig. 5, pl. VII.)

Enfin la culture sur sardine à l'huile donne à l'étuve à 39° une belle teinte rouge carminée qui devient plus foncée en vieillissant. A la température ordinaire, la teinte est la même, mais apparaît plus lentement. La température qui semble la plus favorable au développement du microbe et à la production de sa matière colorante est entre 30° et 39° : c'est ce qui explique son apparition pendant les fortes chaleurs du mois de juillet.

Toutes ces cultures dégagent une forte odeur de triméthylamine.

La matière colorante est soluble dans l'alcool, plus soluble

dans l'eau. La teinture alcoolique possède une belle teinte rose, avivée par l'action des acides, et vire au jaune par l'action des alcalis. L'adjonction d'un acide dans la teinture virée au jaune, lui restitue sa teinte primitive.

Cette espèce, par ses caractères morphologiques et sa propriété chromogène, se rapproche du *micrococcus prodigiosus* et du *bacille de Kiel.*

Les réactions de sa matière colorante la différencient du *prodigiosus,* dont la matière colorante n'est pas soluble dans l'eau. La teinte de la solution alcoolique est moins accentuée.

Elles se rapprochent davantage des réactions de la matière colorante sécrétée par le bacille de Kiel. Celle-ci est cependant plus soluble dans l'alcool, et sa solution alcoolique est plus foncée.

Les cultures différencient nettement le rouge de la sardine du *micrococcus prodigiosus* et du bacille de Kiel. Les cultures de ces deux espèces ne présentent jamais le caractère visqueux qu'offrent les cultures du rouge de sardine, et qui les fait adhérer au fil de platine comme un crachat de pneumonique.

La culture sur gélose, quelquefois rose, mais le plus souvent grise, n'est jamais franchement rouge comme celle du *prodigiosus* et du bacille de Kiel.

Enfin, tandis qu'à une température supérieure à 33°, ces deux espèces perdent leur propriété chromogène et ne donnent plus que des races incolores, la propriété chromogène du rouge est au contraire augmentée.

En même temps que l'étude du pus d'un panaris me conduisait à isoler le microbe rouge de la sardine, M. Auché, pharmacien de la marine, qui avait eu entre les mains une boîte contaminée, mais non soudée, et par conséquent non stérilisée, isolait ce même microbe dont il a fait une étude complète. Ses cultures correspondent exactement à celles que j'ai figurées ici.

IV

Le microbe rouge de la sardine provenant de l'ensemencement du panaris dans un tube de gélatine, ne s'y trouvait pas à l'état de pureté. Un tube de bouillon ensemencé en même temps

n'a pas reproduit la race colorée, mais a donné, par cultures successives, un microbe identique comme morphologie, prenant sur pomme de terre un aspect jaunâtre, et qui semble être une race décolorée du microbe précédent.

L'effervescence notée dans ce premier tube et les lentilles gazeuzes que présentait le tube de gélatine étaient dues à une espèce anaérobie que j'ai pu isoler et cultiver à l'état de pureté.

C'est un bacille mince et de longueur très variable. Dans le bouillon, il offre un aspect sporulé et de longs vibrions.

Ensemencé dans le bouillon, il le trouble en quelques heures à l'étuve, et produit une vive effervescence.

En profondeur dans la gélatine, il ne liquéfie pas, cause un dégagement gazeux très accentué qui la disloque rapidement, et possède une odeur fétide. Quelques colonies végètent au contact de l'air et se montrent sous l'aspect de très petits points blancs.

V

La coïncidence de cette petite épidémie de panaris survenant chez les soudeurs en même temps que le rouge apparaissait dans les boîtes de sardines qu'ils manipulaient, jointe à ce fait que les ensemencements du pus n'ont donné aucune culture des microbes ordinaires de la suppuration, m'a conduit à rechercher, par des expériences sur les animaux, la part pouvant revenir au microbe rouge de la sardine et au microbe anaérobie dans la production des panaris.

Il est difficile de réaliser sur un animal les conditions dans lesquelles se trouvaient les soudeurs. Ceux-ci, travaillant plusieurs heures par jour, avaient les mains sans cesse souillées par l'huile contenant les germes microbiens des boîtes contaminées, et subissaient par la moindre écorchure une inoculation constante, on pourrait dire par irrigation continue.

Les animaux en expérience ont été inoculés par injection sous-cutanée, sous la peau du dos. Une souris a reçu quelques gouttes de culture pure en bouillon du microbe rouge de la sardine. Un rat d'égout en a reçu 1/2 c. c.; un lapin 1 c. c., et un autre lapin 2 c. c. Ces animaux n'ont semblé nullement incommodés, et les résultats de ces expériences ont été absolument négatifs.

Un lapin inoculé avec 1 c. c. de culture pure en bouillon du microbe anaérobie n'en a également pas souffert, et n'a présenté aucun symptôme pathologique.

En présence de ces résultats négatifs, un lapin a été inoculé avec 2 c. c. de mélange à parties égales de culture pure du microbe rouge et de culture pure du microbe anaérobie.

Cinq jours après l'injection, ce lapin, qui n'a présenté aucun symptôme d'infection générale, avait au point d'inoculation un abcès manifeste.

L'abcès a été incisé le neuvième jour; il contenait un pus phlegmoneux, épais, qui a été ensemencé afin de rechercher si l'abcès n'avait pas été causé par quelque impureté.

La culture a reproduit les deux espèces microbiennes inoculées, sans trace d'aucun autre microbe.

Ces deux microbes, inoffensifs quand ils sont isolés, peuvent donc, par leur association, déterminer des suppurations locales, et dès lors il est logique de les considérer comme la cause du panaris dont ils proviennent.

VI

CONCLUSIONS

De l'ensemble des faits relatés au cours de cette étude, il me semble rationnel de tirer les conclusions suivantes :

1° La petite épidémie de panaris observée chez des soudeurs, ordinairement indemnes de cette affection, a été causée, en dehors des microbes ordinaires de la suppuration, par l'association de deux microbes de la putréfaction du poisson, dont l'un, jusqu'ici inconnu, présente un intérêt tout particulier en raison de sa propriété chromogène;

2° Par analogie, il y a tout lieu de supposer que les panaris, considérés comme maladie professionnelle des pêcheurs, doivent être rapportés à la présence des nombreux microbes de la putréfaction du poisson, pullulant dans les milieux où vivent les pêcheurs, et à la toxicité de leurs produits.

Les manipulations des poissons plus ou moins avariés qui servent à amorcer les lignes, sembleraient favoriser leur inoculation.

RÉSULTATS PRATIQUES DES VACCINATIONS

CONTRE LE CHARBON ET LE ROUGET EN FRANCE

PAR M. CH. CHAMBERLAND

Charbon.

A la suite de la célèbre expérience de Pouilly-le-Fort, je fus chargé par MM. Pasteur et Roux de tout ce qui concernait la technique et la pratique des vaccinations charbonneuses.

Douze années se sont écoulées depuis lors. Le moment me semble donc venu de récapituler les résultats, et de porter un jugement définitif sur l'efficacité de la méthode des inoculations préventives.

Chaque année nous demandons à MM. les vétérinaires de nous faire connaître dans un rapport : 1° le nombre des animaux qu'ils ont vaccinés ; 2° le nombre des animaux qui ont succombé après le premier vaccin ; 3° le nombre des animaux qui ont succombé après le deuxième, dans les douze jours qui ont suivi l'inoculation ; 4° le nombre des animaux qui ont succombé pendant le reste de l'année ; 5° enfin la mortalité moyenne annuelle avant la pratique des vaccinations. L'ensemble de tous les rapports est résumé dans le tableau ci-après [1].

En comparant les chiffres de la quatrième colonne avec ceux de la deuxième, on voit qu'un certain nombre de vétérinaires négligent de nous envoyer leurs rapports de fin d'année. Le nombre des rapports qui nous parviennent tend même à diminuer de plus en plus. Cela tient à ce que beaucoup de vétérinaires qui vaccinent chaque année se contentent de nous écrire : « Les résultats sont toujours très bons ; il est inutile de vous envoyer des rapports qui sont toujours les mêmes. »

Nous avons tout lieu de croire en effet que ceux qui n'envoient

1. Les chiffres contenus dans ce tableau ont déjà été donnés en partie dans une note que j'ai publiée dans ces *Annales* (juin 1887).

pas de rapport sont satisfaits, car si un accident se produit dans leur clientèle, ils ne négligent pas de nous le faire connaître aussitôt par lettre spéciale.

Cependant, grâce surtout aux vétérinaires nouveaux qui

VACCINATION CHARBONNEUSE (France).

ANNÉES	NOMBRE total d'animaux vaccinés.	NOMBRE DE RAPPORTS des Vétérinaires	ANIMAUX vaccinés d'après les rapports reçus.	MORTALITÉ Après 1er vaccin.	Après 2e vaccin.	Pendant le reste de l'année.	TOTAL	PERTE totale p. 0/0	PERTE MOYENNE avant vaccination.
				MOUTONS					
1882	270.040	112	243.199	756	847	1.037	2.640	1,08	100 0
1883	268.505	103	193.119	436	272	784	1.492	0,77	—
1884	316.553	109	231.693	770	444	1.033	2.247	0,97	—
1885	342.040	144	280.107	884	735	990	2.609	0,93	—
1886	313.288	88	202.064	652	303	514	1.469	0,72	—
1887	293.572	107	187.811	718	737	968	2 423	1,29	—
1888	269.574	50	101.831	149	181	300	630	0,62	—
1889	239.974	43	88.483	238	285	501	1.024	1,16	—
1890	223.611	69	69.865	331	261	244	836	1,20	—
1891	218.629	65	53.640	181	102	77	360	0,67	—
1892	259.696	70	63.125	319	183	126	628	0,99	—
1893	281.333	30	73.939	234	56	224	514	0,69	—
Totaux.	3.296.815	990	1.788.677	3.668 (0,32)	4.406 (0,24)	6.798 (0,38)	16.872	0,94	—
				BOEUFS OU VACHES					
1882	35.634	127	22.916	22	12	48	82	0,35	5 0/0
1883	26.453	130	20.501	17	1	46	64	0,31	—
1884	33.900	139	22.616	20	13	52	85	0,37	—
1885	34.000	192	21.073	32	8	67	107	0,50	—
1886	39.154	135	22.113	18	7	39	64	0,29	—
1887	48.484	148	28.083	23	18	68	109	0,39	—
1888	34.464	61	10.920	8	4	35	47	0,43	—
1889	32.251	68	11.610	14	7	31	52	0,45	—
1890	33.965	71	11.057	5	4	14	23	0,21	—
1891	40.736	68	10.476	6	4	4	14	0,13	—
1892	41.609	71	9.757	8	3	15	26	0,26	—
1893	38.154	45	9.840	4	1	13	18	0,18	—
Totaux.	438.824	1.255	200.962	177 (0,09)	82 (0,04)	432 (0,21)	691	0,34	—

nous envoient leurs rapports, nous voyons que dans les douze années écoulées au 1er janvier dernier, nous avons eu des renseignements précis sur 1,788,677 moutons et 200,962 bœufs ou vaches, soit environ sur la moitié des animaux vaccinés.

La mortalité sur les moutons et les bœufs est un peu plus grande après le premier vaccin qu'après le second. Ce fait nous paraît s'expliquer aisément. Les animaux signalés morts comprennent en effet ceux qui ont pu succomber aux suites de la vaccination, et ceux qui, étant sous le coup de la maladie, sont morts de *charbon spontané*. Or, au moment de l'inoculation du deuxième vaccin, les animaux sont déjà en partie préservés, d'où une mortalité moins grande par le charbon spontané, par suite un total moins élevé.

La perte totale sur les moutons oscille autour de 1 0/0. La moyenne pour les douze années est de 0,94 0/0. On peut donc dire que *la perte moyenne totale sur les moutons vaccinés, que cette perte résulte des vaccinations ou de la maladie spontanée, est environ de* 1 0/0.

La perte sur les bœufs ou vaches vaccinés est encore moins élevée. Elle est, pour cette même période de douze années, de 0,34 0/0, soit 1/3 0/0 environ.

Ces résultats sont extrêmement satisfaisants. Il faut remarquer en effet que la moyenne de la mortalité annuelle par le charbon avant la vaccination, moyenne qui est donnée dans les mêmes rapports, est évaluée à 10 0/0 sur les moutons et à 5 0/0 sur les bovidés.

En admettant seulement une perte de 6 0/0 sur les moutons et de 3 1/3 0/0 sur les bœufs ou vaches; en évaluant d'autre part à 30 francs la valeur d'un mouton et à 150 francs celle d'un bœuf ou d'une vache, chiffres qui sont certainement au-dessous de la moyenne réelle, un calcul très simple permet d'établir que les bénéfices pour l'agriculture française, résultant de la pratique des vaccinations, se chiffrent par *cinq millions* de francs environ pour les moutons, et à *deux millions* pour les bovidés. Ces chiffres sont plutôt trop faibles que trop forts.

Rouget.

Quelques années après la découverte des vaccins charbonneux, M. Pasteur découvrait les vaccins d'une maladie des porcs connue sous le nom de *rouget*. Dès l'année 1886, les vaccins du rouget étaient préparés et expédiés dans les mêmes

conditions que les vaccins du charbon. Voici le tableau résumant les rapports qui nous sont parvenus sur cette maladie [1].

VACCINATION CONTRE LE ROUGET (France).

ANNÉES	NOMBRE total d'animaux vaccinés.	NOMBRE de rapports de vétérinaires.	ANIMAUX vaccinés d'après les rapports reçus.	MORTALITÉ après 1er vaccin.	MORTALITÉ après 2e vaccin.	MORTALITÉ pendant le reste de l'année.	TOTAL	PERTE totale 0/0.	PERTE moyenne avant la vaccination.
1886	Pendant ces deux années les doses France et étranger sont réunies.	49	7.087	91	21	56	171	2,41	20 0/0
1887		49	7.467	57	10	23	90	1.21	—
1888	15.958	31	6.968	31	25	38	94	1.35	—
1889	19.338	41	11.257	92	12	40	144	1,28	—
1890	17.658	41	14.992	118	64	72	254	1,70	—
1891	20.583	47	17.556	102	34	70	206	1,17	—
1892	37.900	38	10.128	43	19	46	108	1,07	—
Totaux.	111.437	296	75.455	534	188	345	1.067	1,45	—

La moyenne totale des pertes pendant les sept années écoulées est de 1,45 0/0, *soit* 1 1/2 0/0 *environ.*

Cette moyenne est sensiblement plus élevée que pour le charbon. Mais il faut remarquer que la mortalité par le rouget sur les porcs avant la vaccination était beaucoup plus élevée que celle du charbon sur les moutons. Cette mortalité était de 20 0/0 environ; un certain nombre de rapports signalent des pertes de 60 et même 80 0/0. Aussi presque tous les vétérinaires font-ils un grand éloge de la nouvelle vaccination.

Je ne voudrais pas terminer cette statistique sans dire un mot des rares accidents qui nous sont signalés chaque année, soit relativement au charbon, soit relativement au rouget.

Tandis que dix, quinze, vingt vétérinaires reçoivent le même jour le même vaccin et pratiquent des vaccinations sans accident, il arrive parfois que l'un d'entre eux nous signale, sur les animaux inoculés et quelques jours après, des pertes qui s'élèvent quelquefois à 5 et 10 0/0. Heureusement ces accidents sont

1. Les rapports pour l'année 1893 sont encore trop peu nombreux à ce jour pour qu'ils puissent être utilisés dans ce tableau.

extrêmement rares. Les animaux qui succombent ainsi sont comptés dans les statistiques, et on voit qu'ils influent peu sur le résultat final. Mais enfin les accidents existent et causent un préjudice, non seulement au propriétaire qui en est victime, mais encore à la cause même de la vaccination. Nous avons cherché en vain pendant longtemps la cause de ces accidents. Nous croyons la connaître aujourd'hui.

Et d'abord presque toujours ces accidents se manifestent à la suite du premier vaccin, ce qui nous fait penser que souvent les animaux succombent, non aux suites de l'inoculation, mais à la maladie spontanée qui existait déjà sur eux, ou qui était à la veille d'éclater. Quelquefois, il est vrai, les animaux succombent après le deuxième vaccin, ou même après le premier, avec des symptômes qui semblent indiquer que le mal a pris naissance au point d'inoculation. On ne peut pas incriminer le vaccin, attendu que le même vaccin envoyé le même jour à d'autres vétérinaires n'a produit aucun effet nuisible. Il est possible que la question de race et de nourriture joue un rôle, mais ce rôle doit être peu important, attendu que les accidents se produisent un peu partout, dans tous les coins de la France.

Nous pensons plutôt qu'ils doivent être attribués à des impuretés accidentelles qui ont été introduites sous la peau en même temps que le vaccin. Nous savons aujourd'hui, en effet, à n'en pas douter, que deux microbes qui, inoculés séparément sous la peau d'un animal, ne produisant aucune action nuisible, peuvent, lorsqu'ils sont associés, amener la mort. Or, lorsqu'on songe aux conditions dans lesquelles se font ordinairement les inoculations, dans les écuries, sur des animaux ayant la peau souillée, avec des seringues dont les aiguilles se souillent forcément, il est impossible de ne pas admettre que fréquemment des impuretés sont inoculées en même temps que le vaccin. De là ces œdèmes purulents qui nous ont été souvent signalés. Nous pensons que les microbes étrangers sont la principale cause des accidents en question. Il ne nous paraît pas possible de les éviter tout à fait, car la pratique en grand a ses exigences, et ne permet pas toutes les précautions qui sont en usage dans les laboratoires : mais on les évitera en partie en n'oubliant pas que toute impureté introduite sous la peau en même temps que le vaccin peut amener des conséquences mortelles.

LES VACCINATIONS ANTIRABIQUES A L'INSTITUT PASTEUR EN 1893

PAR HENRI POTTEVIN

I

Pendant l'année 1893, 1,648 personnes ont subi intégralement le traitement antirabique à l'Institut Pasteur : 6 sont mortes de la rage ; chez deux d'entre elles, les premiers symptômes rabiques se sont manifestés moins de quinze jours après la dernière inoculation [1].

Nous avons donc :

Personnes traitées	1,648
Morts	4
Mortalité 0/0	0,24

Dans le tableau suivant ces chiffres ont été rapprochés de ceux fournis par les statistiques des années précédentes.

ANNÉES	PERSONNES TRAITÉES	MORTS	MORTALITÉ 0/0
1886	2.671	25	0.94
1887	1.770	14	0.79
1888	1.622	9	0.55
1889	1.830	7	0.38
1890	1.540	5	0.32
1891	1.559	4	0.25
1892	1.790	4	0.22
1893	1.648	4	0.24
TOTAUX	14.430	72	0.50

1. Nous avons insisté, dans les statistiques des années précédentes, sur les motifs pour lesquels il convient, si on veut juger de l'efficacité des vaccinations, de ne faire entrer en ligne de compte, parmi les morts, que les personnes chez lesquelles les premiers symptômes rabiques se sont manifestés plus de quinze jours après la dernière inoculation.

Trois personnes ont été prises de rage au cours des inoculations; une quatrième qui, malgré nos instances, n'avait pas terminé son traitement, est morte également. Le traitement, dans ces quatre cas, n'ayant pas été complet, nous ne pouvons les compter ni au nombre des traités ni au nombre des morts après vaccination.

II

Les personnes traitées à l'Institut Pasteur sont divisées en trois catégories correspondant aux trois tableaux suivants :

1° Tableau A. — La rage de l'animal mordeur a été expérimentalement constatée par le développement de la rage chez des animaux mordus par lui ou inoculés avec son bulbe;

2° Tableau B. — La rage de l'animal mordeur a été constatée par examen vétérinaire;

3° Tableau C. — L'animal mordeur est suspect de rage.

Les morsures, au point de vue de leur siège, sont divisées en trois classes :

1° Morsures à la tête et au visage;

2° Morsures aux mains;

3° Morsures aux membres et au tronc.

Nous donnons ci-dessous les résultats détaillés pour l'année 1893.

	MORSURES à LA TÊTE.			MORSURES aux MAINS.			MORSURES aux MEMBRES.			TOTAUX		
	Traités.	Morts.	Mortalité 0/0.	Traités.	Morts.	Mortalité 0/0.	Traités.	Morts.	Mortalité 0/0.	Traités.	Morts.	Mortalité 0/0.
Tableau A	12	0	0	80	0	0	40	0	0	132	0	0
Tableau B	89	0	0	534	3	0,56	385	0	0	1.008	3	0,30
Tableau C	34	0	0	243	1	0,41	231	0	0	508	1	0,20
TOTAUX	135			857	4		656			1.648	4	0,24

Le tableau suivant contient les résultats acquis depuis l'origine des vaccinations :

	TRAITÉS	MORTS	MORTALITÉ
Morsures à la tête.........	1.213	16	1,32
Morsures aux mains........	8.032	45	0,56
Morsures aux membres.....	5.185	11	0,21
TOTAUX................	14.430	72	0,50

III

Au point de vue de leur nationalité, les 1,648 personnes traitées en 1893 se répartissent de la façon suivante :

Allemagne	2	Grèce	35
Angleterre	23	Hollande	9
Autriche	1	Indes anglaises	14
Belgique	22	Maroc	1
Brésil	1	Portugal	6
Égypte	18	Russie	1
Espagne	43	Suisse	9
États-Unis d'Amérique	1	Turquie	2

Soit 178 étrangers et 1,470 Français.

Nous donnons ci-après la répartition par départements des 1,470 Français. Le tableau contient aussi le nombre total des malades envoyés à l'Institut Pasteur par chaque département pendant les quatre dernières années.

DÉPARTEMENTS	1893	TOTAL	DÉPARTEMENTS	1893	TOTAL
Ain	9	49	Loiret	4	9
Aisne	11	30	Lot	10	33
Allier	5	23	Lot-et-Garonne	27	122
Alpes (Basses-)	7	10	Lozère	2	5
Alpes (Hautes-)	1	22	Maine-et-Loire	0	6
Alpes-Maritimes	10	122	Manche	2	20
Alger	57	304	Marne	3	6
Ardèche	20	50	Marne (Haute-)	0	10
Ardennes	0	3	Mayenne	2	5
Ariège	6	13	Meurthe-et-Moselle	1	18
Aube	4	9	Meuse	1	1
Aude	29	89	Morbihan	4	10
Aveyron	19	56	Nièvre	1	1
Bouches-du-Rhône	33	174	Nord	56	137
Calvados	0	11	Oise	7	54
Cantal	3	18	Oran	165	456
Charente	1	21	Orne	12	17
Charente-Inférieure	1	22	Pas-de-Calais	51	99
Cher	6	9	Puy-de-Dôme	1	13
Constantine	86	189	Pyrénées (Basses-)	7	140
Corrèze	5	21	Pyrénées (Hautes-)	4	25
Corse	1	1	Pyrénées-Orientales	7	45
Côte-d'Or	9	30	Rhin (Haut-)	4	11
Côtes-du-Nord	12	30	Rhône	32	227
Creuse	2	19	Saône (Haute-)	2	35
Dordogne	2	45	Saône-et-Loire	8	37
Doubs	2	22	Sarthe	11	16
Drôme	22	99	Savoie	41	113
Eure	5	13	Savoie (Haute-)	19	36
Eure-et-Loir	8	14	Seine	254	935
Finistère	9	15	Seine-et-Marne	6	18
Gard	26	88	Seine-et-Oise	28	170
Garonne (Haute-)	14	76	Seine-Inférieure	9	30
Gers	13	49	Sèvres (Deux-)	4	14
Gironde	4	82	Somme	19	45
Hérault	35	151	Tarn	12	51
Ille-et-Vilaine	5	17	Tarn-et-Garonne	5	45
Indre	1	14	Tunisie	37	113
Indre-et-Loire	2	15	Var	7	34
Isère	36	131	Vaucluse	20	69
Jura	1	17	Vendée	0	4
Landes	7	57	Vienne	1	8
Loir-et-Cher	0	18	Vienne (Haute-)	4	11
Loire	46	195	Vosges	1	24
Loire (Haute-)	2	24	Yonne	0	2
Loire-Inférieure	3	5			

UN PROCÉDÉ SÛR DE STÉRILISATION DU CATGUT

PAR LE D[r] RÉPIN.

(Travail du Laboratoire de M. Roux, à l'Institut Pasteur.)

Le catgut, sous l'action de l'eau bouillante ou de sa vapeur, se transforme en gélatine; il ne peut donc être stérilisé par la chaleur humide comme les autres matériaux de pansement. Pour remédier à ce défaut, sans lequel la corde à boyau n'aurait probablement jamais eu de rival comme fil chirurgical, de nombreux procédés de désinfection chimique par les antiseptiques ont été essayés. Il est reconnu aujourd'hui qu'aucun de ces procédés ne donne de garantie complète, soit parce que les liquides autres que l'eau, choisis comme solvants, neutralisent l'action des antiseptiques, soit parce que les solutions aqueuses, d'ailleurs peu favorables à la conservation du catgut, sont sujettes à se décomposer spontanément. Lenti[1], qui a repris récemment l'étude de cette question, est arrivé aux conclusions suivantes : l'acide phénique et le lysol dissous dans l'huile d'olive perdent complètement leur action désinfectante; la glycérine empêche l'action des solutions de sublimé à 2 0/00 quand la proportion d'eau qu'elle contient est inférieure à 40 0/0, et celle de l'acide phénique à 10 0/0 quand la proportion d'eau qu'elle contient est inférieure à 80 0/0; l'alcool absolu annihile complètement le pouvoir bactéricide du sublimé et de l'acide phénique. En outre, dans ces mêmes liquides étendus d'eau, le pouvoir désinfectant des antiseptiques ne reparaît que partiellement. Pour les solutions purement aqueuses, on sait que certaines d'entre elles, celles de sublimé par exemple, se décomposent assez rapidement à l'air, et bien plus rapidement encore en présence d'une matière organique comme le catgut. On ne saurait donc s'étonner des résultats fournis par les recherches

1. *Revue d'hygiène*, 20 décembre 1893.

bactériologiques comme celles de Brunner[1] qui, ayant mis à l'épreuve plusieurs centaines de flacons, de provenances diverses, de catgut conservé dans l'huile phéniquée, dans l'essence de genévrier, dans des solutions d'acide chromique, etc., a constaté que la plupart donnaient des cultures de microbes. On s'explique également très bien les faits d'infection imputés au catgut, tels que les cas de charbon rapportés par Koch et les séries publiées par Kocher. De tels accidents, trop souvent répétés, ont déterminé un certain nombre de chirurgiens à remplacer le catgut par la soie, qui ne possède pas les qualités spéciales de la corde à boyau, notamment celle d'être résorbée dans l'organisme, mais qui peut être stérilisée à l'autoclave. D'autres, au contraire, ne se sont pas résignés aussi facilement à se priver des services du précieux produit introduit par Lister, et, dans ces dernières années, de nombreux procédés de stérilisation du catgut, basés sur l'emploi de la chaleur, ont été proposés.

Reverdin[2] a fait faire un grand pas au problème en montrant que le catgut peut, moyennant certaines précautions, être soumis sans dommage à une chaleur sèche de 140° pendant quatre heures. Il a obtenu ainsi un catgut excellent à l'usage et trouvé aseptique à l'examen bactériologique. Nous avons, comme beaucoup d'autres, obtenu de bons résultats par la méthode de Reverdin. Malheureusement, l'emploi de l'étuve sèche est limité par les défauts inhérents à l'appareil lui-même. On sait en effet que, dans les étuves dites à air chaud, c'est la chaleur rayonnante émise par les parois qui agit principalement; chaque objet en reçoit une somme très inégale, suivant la distance qui le sépare du foyer et de la paroi, et il ne prend qu'une température bien inférieure à celle indiquée par le thermomètre placé dans l'enceinte, lorsque quelque enveloppe, ou quelque corps interposé, le sépare de la surface rayonnante. On est donc obligé, pour rester maître des conditions de l'opération, de ne stériliser que de petites quantités de catgut à la fois, et de le stériliser à l'air libre, c'est-à-dire sans pouvoir le munir d'aucun système d'enveloppe et de protection, qui permettrait ensuite de le conserver indéfiniment à l'état aseptique, de le transpor-

1. BRUNNER. Ueber catgutinfection. (*Beitrage zur Klinische Chirurgie von Bruns*, 1890, B. VI, p. 98.)

2. REVERDIN. Recherches sur la stérilisation du catgut et d'autres substances employées en chirurgie. (*Revue de la Suisse Romande*, 1888.)

ter et de l'utiliser par fractions, comme cela a lieu pour le catgut en flacons.

On a donc dû chercher à remplacer l'air chaud par des liquides ou des vapeurs, qui, sans altérer le catgut comme le fait la vapeur d'eau, fussent d'un emploi aussi sûr et aussi régulier que celle-ci. Schimmelbusch a reconnu qu'un grand nombre d'huiles et d'essences réalisent la première condition, par exemple les huiles éthérées, l'huile de bergamotte, d'œillette, d'aniline, etc. Brünner[1] a fait la même constatation pour le xylol, et il a préconisé un procédé consistant à placer le catgut dans un flacon fermé en présence du xylol, et à plonger le flacon pendant trois heures dans la vapeur d'eau à 100°. Il est incontestable que cette méthode possède, sur celle de l'air sec, l'avantage d'assurer une répartition uniforme et une graduation facile de la chaleur : on est sûr que tout objet, à la surface duquel se fait une condensation de vapeur, est porté à la température précise de formation de cette vapeur. Malgré cela, les auteurs qui ont étudié ce procédé ont été surpris de ne lui trouver qu'une efficacité bien inférieure à celle de la vapeur d'eau à 100°, et cela, même avec des liquides bouillant à des températures de 130 ou 140° et portés à l'ébullition.

Ce résultat s'explique aisément. La vapeur d'eau, en effet, doit sa puissance spéciale à la propriété purement physique que possède l'eau de mouiller la membrane d'enveloppe des spores, de la traverser par voie d'osmose, et de permettre la coagulation du protoplasma sous l'action de la chaleur. Si, de plus, cette vapeur possède une pression propre, on conçoit que sa vitesse et sa puissance de pénétration se trouvent accrues en proportion. Aussi suffit-il de surchauffer la vapeur d'eau à 110° ou 115°, en vase clos, pour lui conférer un pouvoir destructeur rapide et absolu, tandis que l'air et les vapeurs non comprimées doivent être portées à 150° et agir pendant des heures, pour exercer une action germicide comparable.

La première condition, pour stériliser par l'action d'une vapeur quelconque, est donc d'employer cette vapeur sous pression. Les premiers essais que je fis dans cet ordre d'idées, dans le laboratoire de M. le Dr François Franck, au Collège de France,

1. Brunner. Weitere Versuche ueber Catgutsterilisation. (*Beitrage z. Klin. Chir. von Bruns.*, Bd VII, p. 447.)

furent effectués avec le toluène, qui bout à 111°. Le catgut était enfermé, en présence d'une petite quantité de toluène, dans des tubes scellés que je chauffais à l'autoclave à 130°. J'obtins ainsi des résultats bien supérieurs à ceux que donne l'air sec; il suffisait en effet de prolonger le chauffage pendant trente minutes pour obtenir à coup sûr la stérilisation du catgut. Mais lorsque j'entrepris, sur les indications de M. Roux, des expériences de contrôle avec des spores particulièrement résistantes, les résultats furent tout autres que ceux que l'on aurait pu attendre. Le même traitement qui fournissait constamment du catgut stérile se montra impuissant à stériliser des poussières dans lesquelles se trouvaient des spores de *B. subtilis*. Ce fait démontre bien que de simples essais bactériologiques ne permettent pas de compter sur l'innocuité absolue du catgut : de nombreux tubes de culture auront pu rester stériles, alors qu'il subsistera en quelque point des spores pathogènes résistantes, comme celles du *B. anthracis*, susceptibles de se réveiller, une fois inoculées. Il est donc nécessaire que la méthode employée ait fait ses preuves directement à l'égard des espèces pathogènes les plus résistantes, non seulement par le moyen des cultures *in vitro*, mais aussi par celui des inoculations.

Il manquait en réalité quelque chose à la vapeur de toluène pour constituer un bon agent de désinfection : cet hydrocarbure n'est pas miscible à l'eau, il est probable que sa vapeur ne mouille qu'imparfaitement les corps organisés, qui ont une grande affinité pour l'eau et en retiennent toujours des traces. C'est alors que M. Roux me conseilla d'essayer de la vapeur d'alcool, dont il avait lui-même obtenu autrefois de bons résultats pour la stérilisation des matières organiques délicates. L'étude méthodique de cet agent prouva en effet qu'il constitue un excellent moyen de stérilisation du catgut : d'une part, il n'enlève à la corde à boyau aucune de ses qualités propres, d'autre part il possède une puissance de stérilisation comparable à celle de la vapeur d'eau.

Action de la vapeur d'alcool sur le catgut. — La première condition pour cette étude est d'opérer sur du catgut parfaitement dégraissé et déshydraté. Le catgut du commerce contient en effet une forte proportion de graisse que l'on y ajoute pendant la fabrication, et dont la présence, comme l'a montré Reverdin,

entraîne infailliblement l'altération du catgut lorsqu'on vient à le chauffer. Le meilleur procédé de dégraissage consiste à placer le catgut dans une allonge mise en communication, par son orifice inférieur, avec un ballon dans lequel on distille de l'éther ou du sulfure de carbone, et, par son orifice supérieur, avec un serpentin condensateur. Les vapeurs condensées, retombant incessamment sur le catgut, entraînent rapidement toutes les matières grasses. On obtient ainsi un produit sensiblement différent de celui du commerce, blanc, inodore, se gonflant rapidement dans l'eau et devenant alors très souple sans être glissant. Il faut ensuite le déshydrater. Le catgut possède une telle affinité pour l'eau qu'il en renferme toujours, d'après mes pesées, de 20 à 25 0/0 de son poids. Or, il suffit de la présence d'une trace d'eau presque impondérable pour amener sa désorganisation dès que la température dépasse 100°. La dessiccation peut être obtenue, soit dans le dessiccateur à acide sulfurique, soit dans l'étuve à air chaud, que l'on chauffera lentement et que l'on maintiendra pendant une heure à 110° environ. Il faudra avoir soin, dans ce dernier cas, que le catgut ne présente nulle part des coudures brusques qui constitueraient plus tard autant de points de moindre résistance.

Le catgut, ainsi dégraissé et déshydraté, a été chauffé dans des tubes scellés à des températures variant de 100 à 130°, en présence de l'alcool absolu ou à différents degrés d'hydratation. Le résultat a été le suivant. A 100°, l'alcool à 90°, pas plus que l'alcool absolu, n'exerce aucune action nocive sur le catgut, quelle que soit la durée de l'expérience. Mais à mesure que l'on s'élève au-dessus de 100°, l'alcool aqueux, même s'il ne contient que 1 0/0 d'eau, exerce une action destructive d'autant plus prononcée et plus rapide que la température est plus élevée. Ainsi à 115°, le catgut peut encore être chauffé impunément avec de l'alcool à 98° tandis qu'après vingt minutes de chauffe, il est altéré. Au contraire, l'alcool absolu reste toujours inoffensif, même si on élève la température jusqu'à 130° et si on l'y maintient pendant une heure et plus. Le catgut soumis à une pareille épreuve n'est modifié en rien ni dans son apparence, ni dans ses qualités : sa résistance à la rupture, que j'ai mesurée au dynamomètre, avant et après le chauffage, n'a pas été diminuée, son élasticité est restée la même, ainsi que sa faculté

d'imbibition dans l'eau et sa souplesse, une fois imbibé.

Action de la vapeur d'alcool sur les microbes. — Il s'agissait maintenant de savoir quelle était la valeur de ce chauffage dans la vapeur d'alcool sous pression, comme méthode de destruction des germes. Pour cela, nous avons agi : 1° sur des spores de microbes, nombreuses et variées, placées dans de bonnes conditions de résistance ; 2° sur du catgut infecté, au moment de sa fabrication, avec des spores du vibrion septique et de la bactéridie charbonneuse ; 3° sur du catgut confectionné avec l'intestin d'un animal charbonneux.

Nous avons pris des échantillons de terre de jardin, de foin, des poussières diverses, des fils chargés de cultures de charbon sporifère ; nous les avons desséchés soigneusement dans le vide sur l'acide sulfurique afin d'éliminer l'eau dont la présence eût pu fausser l'expérience ; nous les avons enfermés avec un peu d'alcool absolu, dans des tubes également bien desséchés et scellés à la lampe, après en avoir en chassé l'air. Après chauffage, les tubes étaient ouverts, on y introduisait avec pureté la quantité de bouillon stérile nécessaire pour noyer l'échantillon, et on les mettait à l'étuve. Nous avons ainsi constaté que le chauffage à 100°, même prolongé pendant une heure, est toujours insuffisant pour produire la stérilisation. Mais si l'on élève à la fois la température et la pression, les résultats changent aussitôt, et la stérilisation est obtenue plus ou moins rapidement suivant la nature de la matière mise en expérience. A 120°, si le chauffage ne dure que trente minutes, 30 0/0 des tubes donnent encore des cultures, très retardées il est vrai, de *B. subtilis* dont les spores sont, comme on sait, les plus résistantes de toutes ; s'il est prolongé pendant quarante-cinq minutes, la stérilisation est toujours complète : quarante-cinq minutes à 120°, telle est donc la limite qu'il est nécessaire et suffisant d'atteindre pour obtenir la destruction des germes les plus résistants, dans les conditions ordinaires, avec la vapeur d'alcool. Pour nous assurer de la faculté de pénétration de cette vapeur, nous avons répété les mêmes expériences en enfermant les matières à stériliser dans un grand nombre de doubles de papier filtré fortement comprimés : là encore, le succès a été complet.

Dans une deuxième série d'expériences nous avons fabriqué nous-même du catgut en contaminant, au préalable, la mem-

brane fibreuse de l'intestin du mouton avec des poussières, avec des cultures, reconnues sporifères par une expérience spéciale, de *B. anthracis*, avec du sang d'un animal tué par le vibrion septique, et laissé vingt-quatre heures à l'étuve, à l'abri de l'air. pour provoquer la formation des spores. Ce catgut était ensuite desséché et chauffé dans la vapeur d'alcool, puis on recherchait la présence des microbes par la méthode des cultures et par celle des inoculations. Constamment la stérilisation a été reconnue complète.

Les essais que nous avons faits avec le bacille du tétanos nous paraissent présenter un intérêt particulier. On sait, en effet, que ce bacille est constamment présent dans l'intestin des herbivores et par conséquent, dans celui du mouton, qui est employé à la fabrication du catgut. Ses spores, qui sont douées d'une grande résistance, peuvent donc, comme celles du charbon, se retrouver dans la corde à boyau, et il est naturel de penser que les cas de tétanos post-opératoire, que l'on observe encore, de temps à autre, en dépit d'une antisepsie soignée, sont le plus souvent imputables à un catgut mal désinfecté. Nous sommes même convaincu que cette démonstration aurait déjà été faite, comme elle l'a été pour le charbon, si le tétanos se prêtait aussi facilement que le charbon aux recherches expérimentales.

Pour voir comment le bacille du tétanos se comporte vis-à-vis de la vapeur d'alcool surchauffée, nous avons pu utiliser des échardes tétanifères qui avaient servi aux recherches de MM. Roux et Vaillard sur le tétanos. L'une de ces échardes fut chauffée à 80° pendant cinq minutes, puis insérée, avec quelques gouttes d'une culture de coccus favorisant, sous la peau d'un cobaye qui mourut tétanique le troisième jour. Les autres furent chauffées 45 minutes à 120° dans la vapeur d'alcool absolu, puis imprégnées également de la culture favorisante, et inoculées à trois cobayes. Aucun de ces animaux ne fut atteint du tétanos.

Afin de se placer dans des conditions plus démonstratives encore, il restait à opérer sur un catgut provenant d'un animal charbonneux. Nous avons donc inoculé une culture très virulente de *B. anthracis* à un cobaye; après la mort de l'animal, l'intestin a été détaché, lavé et placé à l'étuve à 35° pendant douze heures, à l'air, pour favoriser la sporulation du bacille. Une portion de cet intestin a été plongée pendant dix minutes dans l'eau

chauffée à 80° afin de tuer les bacilles et de ne laisser vivants que les spores, puis insérée dans le tissu cellulaire sous-cutané d'un cobaye qui est mort de charbon typique le troisième jour. L'existence des spores se trouvait ainsi démontrée. Le restant de l'intestin, bien desséché, a alors été chauffé dans des tubes scellés, en présence de l'alcool absolu, à 120° pendant quarante-cinq minutes, puis inoculé à trois cobayes. Aucun de ces animaux n'a présenté des signes d'infection charbonneuse; au bout de huit jours, nous avons constaté que la résorption des fragments d'intestin inoculés était complète.

Il est donc démontré que la stérilisation du catgut par la vapeur d'alcool sous pression, dans les conditions de temps et de température que nous avons déterminées, est une méthode sur laquelle on peut compter d'une façon absolue pour obtenir un produit rigoureusement aseptique; elle est applicable en grand sans rien perdre de sa sûreté. Je résume brièvement cette méthode :

1° Dégraisser le catgut par l'éther ou le sulfure de carbone, de préférence à chaud, dans un appareil à épuisement, ou, à défaut, par un séjour prolongé dans des flacons dont on renouvellera le liquide à plusieurs reprises. Rouler le catgut en rond, de manière à éviter les angles vifs, avant de le soumettre aux opérations suivantes ;

2° Le dessécher à fond par un chauffage à l'étuve sèche, qui devra être conduit lentement et porté jusqu'à 110° environ ;

3° Procéder aussitôt après à la stérilisation, afin que le catgut n'ait pas le temps d'absorber de l'eau de nouveau. Le placer avec une petite quantité d'alcool anhydre dans un récipient hermétiquement clos et suffisamment résistant, qui peut être un simple tube de verre fermé à la lampe, ou un cylindre métallique, muni d'un couvercle à vis de pression et à garniture de caoutchouc. Mettre ce récipient dans une autoclave que l'on portera à 120° pendant une heure, afin de dépasser largement la limite requise.

Rien n'empêcherait de compléter cette préparation par le passage du catgut dans une solution d'acide chromique entre le dégraissage et la dessiccation, mais, telle que nous venons de la décrire, elle donne un produit dont la qualité ne laisse rien à désirer.

REVUES ET ANALYSES

LA PURIFICATION SPONTANÉE DES EAUX DE FLEUVES

REVUE CRITIQUE

Dans une *Revue* récente (février 1894), j'ai étudié quelques-unes des actions qui président à la purification naturelle des eaux de fleuves, de rivières ou de lacs. Un travail[1] de MM. P. Frankland et Marshall Ward va nous remémorer les faits acquis, et nous servir de transition avec les actions que je voudrais étudier aujourd'hui.

Ces savants ont cherché ce que devenait le *B. anthracis* introduit artificiellement, soit à l'état de bâtonnets, soit sous forme de spores, dans des eaux potables comme celle de la Tamise qui alimente Londres, ou du lac Katrine qui alimente Glasgow. C'est avec les spores qu'ils ont obtenu les résultats les plus nets. On sait combien ces spores sont résistantes. En les introduisant d'abord dans de l'eau stérilisée, soit par ébullition, soit à la bougie, de façon à supprimer toute concurrence vitale avec les bactéries étrangères, ils ont vu ces spores conserver pendant plusieurs mois leur vitalité et leur virulence, quelle que fût l'eau employée, quel que fût son mode de stérilisation. Il importait également peu que la température fût celle de l'hiver ou celle de l'été, et que la conservation eût lieu à l'obscurité ou à la lumière diffuse. Dans ces eaux maintenues en repos, les spores tombaient certainement au fond du vase, comme cela avait lieu dans les expériences faites autrefois par MM. Pasteur et Joubert. Il y avait donc dans les couches superficielles une purification par dépôt, en vertu d'actions physiques, dont on aurait pu augmenter la puissance par un *collage* minéral ou organique. C'est la première des actions purificatrices, que nous avons étudiée page 120 de ce volume.

Mettons maintenant en jeu des questions de concurrence vitale, en

1. Vitalité et virulence du *bacillus anthracis* et de ses spores dans les eaux potables. (*Proceed. of the Royal Society*, t. 53.)

introduisant nos spores dans de l'eau non stérilisée. Nous verrons, dans l'ensemble, ces spores diminuer peu à peu de nombre et de virulence, si bien qu'il sera bientôt impossible de les découvrir au milieu des colonies liquéfiantes des bacilles de l'eau. Pour les mettre en évidence, il est alors nécessaire d'additionner l'eau contaminée d'un tiers environ de son volume de bouillon stérile, et de la chauffer pendant deux à trois minutes à 50°, puis à 70°, puis à 90°, après quoi on soumet le mélange à une culture sur plaques. Les bacilles liquéfiants sont presque tous tués, et les colonies de bacilles charbonneux ont le temps de former leurs colonies, si faciles à reconnaître. On trouve ainsi que, bien que le nombre des spores vivantes décroisse avec le temps, il en reste encore après des mois. En outre, ainsi qu'on pouvait s'y attendre, puisqu'il s'agit de concurrence vitale, les eaux de Londres et celles de Glasgow ne se comportent plus de la même façon, comme elles le faisaient tout à l'heure lorsqu'elles étaient stériles.

Dans les eaux de la Tamise, la diminution du nombre des spores a suivi à peu près la même marche, que l'eau fût conservée à 4-9°, ou à 18-20°. Mais pour celles du lac Katrine, il n'y avait plus, au bout de trois mois de conservation à la température de l'été, de colonies charbonneuses dans la culture d'une eau qui en avait donné à l'origine 5,000 par centimètre cube, tandis qu'on en trouvait encore beaucoup dans l'eau conservée à la température de l'hiver. Mêmes différences pour la virulence. Une souris inoculée avec une petite quantité de l'eau refroidie mourait, tandis qu'elle résistait avec une quantité égale de l'eau maintenue à 18-20°. Toutefois, il n'y avait, à proprement parler, de diminution que dans le nombre des éléments virulents, et non dans leur virulence propre, car, en faisant une culture en bouillon des derniers bacilles charbonneux survivant dans l'eau conservée à la température de l'été, on les retrouvait aussi virulents qu'au début.

Quoi qu'il en soit, la conservation à froid était plus dangereuse avec l'eau du lac Katrine que la conservation à chaud, et on ne peut attribuer cette différence singulière qu'à ceci : c'est que les bactéries de l'eau s'étaient infiniment plus développées à chaud qu'à froid, à raison de la richesse en matière organique des eaux du lac, et avaient pu exercer vis-à-vis des bacilles du charbon une concurrence vitale plus énergique.

Et c'est ainsi que, comme nous l'avons montré si souvent, il y a eau et eau, et qu'on ne doit jamais conclure de l'une à l'autre. S'il fallait un nouvel exemple de l'exactitude de cette loi, nous le trouverions dans la comparaison de l'eau de Londres et de celle de Glasgow. Nous venons d'accuser entre elles des différences dans la matière organique. Il faudrait ajouter que ce sont des différences de qualité, plutôt que des

différences de quantité, qui est à peu près la même dans les deux. Mais celle du lac Katrine est plus voisine de son état organisé, moins oxydée que celle de la Tamise. Elle est donc plus nutritive, et nous retrouvons là les considérations développées à la fin de notre dernière *Revue* : les eaux les plus stables, celles qui craignent le moins la contamination, sont celles qui l'ont subie à fond. Il y a aussi pour les eaux des vaccinations préservatrices.

Voici maintenant qui nous amène sur un terrain nouveau. Tous les résultats qui précèdent restent les mêmes, que les eaux, stérilisées ou non, restent à l'obscurité ou à la lumière du jour. Mais si on les expose au rayonnement direct du soleil, les spores disparaissent très vite, et plus vite encore dans les eaux non stérilisées que dans les autres.

Cette question de l'action solaire a été abordée à plusieurs reprises dans ces *Annales*[1], et même c'est la spore charbonneuse qui a presque toujours servi de *test-objet*[2] pour les expériences d'atténuation et de destruction solaire. On ne voit pas bien pourquoi elle a été choisie. La bactéridie charbonneuse est rare ou absente dans le sol et dans les eaux. Nous n'avons aucun intérêt pratique à savoir comment elle se comporte, et quelles sont les lois de sa résistance dans ces milieux qui ne lui conviennent pas, et où elle est soumise, comme nous venons de le voir, à la concurrence victorieuse des bactéries banales. Comme elle est très résistante, nous sommes exposés, en jugeant d'après elle, à considérer comme inefficaces des actions qui peuvent être très puissantes au contraire vis-à-vis de germes de maladie nous venant de préférence par l'eau, comme ceux de la fièvre typhoïde ou du choléra. Par contre, il est vrai, nous pourrons avoir confiance dans la puissance des actions qui auront raison des spores charbonneuses.

Sous ce point de vue nous trouvons, dans le mémoire de MM. P. Frankland et Marshall Ward, des faits très intéressants. Une de leurs expériences va nous mettre au courant de leur méthode de travail, et nous donner une idée de leurs résultats.

Une cuvette plate de Petri, contenant une mince couche de gélatine ensemencée avec des spores charbonneuses, repose sur un disque de papier noir dans lequel est découpée, en large majuscule, une lettre de l'alphabet. Le tout est placé, le 30 novembre, à 9 h. 30 du

1. Voir t. I, p. 88; t. III, p. 686; t. IV, p. 792, des Revues sur ce sujet et les mémoires de M. Roux (t. I, p. 483), de MM. Straus et Dubarry (t. IV, p. 109), et de M. Momont (t. VI, p. 21).

2. Voir Wolffhugel et Riedel (*Arb. a. d., Kais. Gesundh.*, t. I, p. 886, p. 455). — Meade Bolton (*Zeitschr. f. Hyg.* 1886, p. 76) — Koch (*Gartner-Tiemann*, p. 585). — Hochstetter (*Arb. a. d. Kais. Gesundh.* t. II, p. 1). — Hueppe (*Journ. f. Gasbeleucht.*, 1887, p. 129). — Gartner (*Gartner-Tiemann, Untersuch. d. Wassers*, p. 588). — Kraus (*Archiv. f. Hyg.*, t. VI, p. 234). — Karlinski (*Id.*, 1889, p. 113). — Uffelmann (*Centralbl. f. Bact.*, t. V, p. 89).

matin, sur un support annulaire, et exposé à la lumière, réfléchie par une glace, du faible soleil de la journée, jusqu'à 3 h. 30 du soir, ce qui fait en somme une exposition de six heures à la lumière réfléchie. La boîte de Petri, rapportée à l'étuve, a donné, au bout de quarante-huit heures, la belle majuscule découpée comme à l'emporte-pièce dans la gélatine, et se détachant par sa transparence sur le fond grisâtre que formaient les colonies de bactéridies charbonneuses, nées en rangs serrés partout où la lumière, en traversant la gélatine, ne l'avait pas stérilisée sur son passage.

Il était impossible de songer à attribuer cette stérilisation à l'action de la chaleur solaire : c'était en automne, la lumière employée était de la lumière réfléchie, et d'ailleurs la gélatine, qui fondait à 29°, était restée ferme. Des rayons d'hiver sont donc capables de tuer rapidement des spores, et, dans la lumière, ce n'est pas la chaleur qui agit, c'est le rayonnement chimique.

Quelques précautions sont nécessaires pour bien réussir cette expérience. La bactéridie charbonneuse liquéfie la gélatine, et comme il faut ensemencer largement, on risque d'introduire, avec la semence, assez de spores non mûres ou de diastases pour que la gélatine insolée devienne prompte à la liquéfaction. Il faut donc d'abord porter les spores dans de l'eau stérilisée qu'on laisse vingt-quatre heures à 56°. Les spores non mûres mûrissent ou périssent, la diastase est détruite, et l'on a comme résidu des spores virulentes qui se prêtent bien à l'expérience.

Cette ingénieuse méthode de démonstration avait été employée un an auparavant par M. Buchner (*l. c.*) pour étudier la façon dont se comportent, à la lumière solaire, des espèces plus banales que la bactéridie charbonneuse, le bacille typhique, celui du choléra, le *bacillus coli* et le *bacillus pyocyaneus*, et il avait obtenu, au bout d'une heure ou une heure et demie à la lumière solaire directe, ou après cinq heures d'exposition à la lumière diffuse, une stérilisation complète sur le passage des rayons lumineux. Avec des caractères découpés, on avait sur la gélatine des lettres transparentes sur un fond opaque ; avec des caractères opaques, des inscriptions en gris sur un fond transparent. A ces expériences, comme à celles de MM. P. Frankland et Marshall Ward, on aurait pu objecter, en se rappelant les résultats de Roux (*l. c.*), que s'il n'y avait pas développement sur le trajet des rayons lumineux, c'était peut-être que le milieu avait été chimiquement oxydé et rendu impropre à la culture des bacilles. C'est en effet ce qui arrive quelquefois, et nous trouverons bientôt une explication plausible de ce fait. Mais là comme partout, il ne faut rien généraliser, et on peut montrer de deux façons que c'est l'action sur la spore, et non l'action

sur le milieu nutritif, qui est ici la chose essentielle. M. Buchner expose pour cela tout d'abord sa gélose non ensemencée au soleil, puis la liquéfie, l'ensemence et l'expose de nouveau à l'action solaire. Aucune différence ne se révèle avec une gélose non insolée au préalable. La démonstration de MM. P. Frankland et Marshall Ward est encore plus simple et plus topique. Ils exposent au soleil, au-dessus d'une lettre découpée, une couche très mince de spores, sans gélose, mettent ensuite la couche de gélose : la lettre apparaît en clair sur fond grisâtre ; ils font l'inverse, exposent au soleil la gélose non ensemencée qu'ils recouvrent ensuite d'une mince couche de spores. Le développement est uniforme partout.

L'action solaire s'adresse donc quelquefois, sinon toujours, à la spore elle-même, et cela est fort heureux au point de vue hygiénique, car cela nous rend indépendants des questions variables de milieu. Mais, comme nous nous occupons en ce moment d'une question pratique, nous avons besoin de renseignements autres que ceux que peuvent nous fournir les expériences qui précèdent. Comment se comportent dans l'eau les bacilles dangereux qu'elle est exposée à renfermer, et les autres? Nous avons vu, dans notre première *Revue*, qu'en huit heures, les eaux de l'Isar, à Munich, se débarrassaient de leurs germes vivants. Aucune des actions que nous avons étudiées dans cette revue ne peut nous rendre compte de cette destruction rapide. L'action solaire est-elle en mesure de nous l'expliquer ? C'est là une question sur laquelle on pouvait conserver quelques doutes, mais à laquelle il faut répondre affirmativement aujourd'hui.

Voici en effet des résultats de M. Buchner qui sont probants. Ce savant opérait en comptant, par la méthode des plaques de gélatine, le nombre des colonies d'une eau insolée et de la même eau conservée le même temps à l'obscurité, autant que possible à la même température, laquelle, du reste, ne s'est jamais assez élevée pour qu'on puisse lui attribuer une part sensible dans le phénomène. Dès ses premières expériences, M. Buchner a vu que le nombre des germes subissait une décroissance rapide dans l'eau insolée, une décroissance plus lente dans l'eau conservée à l'obscurité. Attribuant ce dernier effet à ce que l'eau dont il se servait n'était pas assez nutritive, il eut ensuite la précaution d'y ajouter une petite quantité de bouillon, et alors il voyait l'eau insolée se dépeupler, tandis que l'autre se peuplait davantage pendant son séjour dans l'obscurité. L'expérience devient ainsi plus frappante, mais en perdant un peu de sa valeur pratique.

Quoi qu'il en soit, elle reste probante. Pour détruire des germes des *Bac. typhi*, *coli*, et *pyocyaneus*, semés en grande abondance dans l'eau, il a suffi, pendant les mois de mai et juin 1892, à Munich, de

durées d'exposition qui ont varié de trois jours à la lumière diffuse à une heure à la lumière du soleil. Pour donner une idée de la marche rapide de cette destruction au soleil, je citerai une expérience dans laquelle on a introduit le *B. pyocyaneus*, plus résistant que les autres, dans un demi-litre d'eau des conduites de Munich, non stérilisée, et contenue dans un cylindre de verre. Cette eau avait été chauffée au préalable à 25°, La température a monté jusqu'à 30°,3 dans l'échantillon insolé, jusqu'à 27°8 dans l'autre. Je mets à côté les nombres déjà obtenus par Pansini, avec une culture en bouillon des bacilles charbonneux sans spores, exposée au soleil de Naples le 12 mai, à une température de 32°-40°.

	Bac. charbonneux au soleil.	Bac. pyocyaneus Soleil.	Bac. pyocyaneus Obscurité.
Nombre initial	—	—	—
après 10 minutes	2,520 col.	142,000	135,000
—	360	98,400	—
— 20 —	130	54,400	—
— 30 —	4	42,600	—
— 45 —	»	8,400	—
— 60 —	5	0	150,000
— 70 —	0	»	

On voit que la destruction est rapide, et que quelques germes seuls se montrent plus résistants. En somme, dans toutes ces expériences faites sur de l'eau en petite épaisseur, et suffisamment transparente pour se pénétrer de lumière, on peut dire qu'une heure d'insolation suffit à détruire les germes étudiés.

Quand on augmente l'épaisseur, quand, au lieu de vases de verre, on emploie des vases opaques ouverts seulement par en haut, il faut naturellement plus de temps pour la stérilisation solaire. Quand avec cela l'eau est légèrement trouble et arrête la lumière dans ses couches superficielles au lieu de s'en imbiber également dans toute son épaisseur, il faut encore plus longtemps. Mais, même dans ces cas défavorables, la stérilisation est moins longue qu'on ne pourrait le croire. J'en ai pour garant des expériences dans lesquelles M. Procaccini[1] s'est proposé de rechercher combien de temps durait la stérilisation solaire d'une eau d'égout de Naples, puisée à Chiatamone. Cette eau contenait à ce moment de 298,000 à 420,000 bactéries au centimètre cube. Les eaux d'égout étant toujours diluées, soit qu'elles arrivent dans un fleuve, soit qu'elles débouchent dans la mer, M. Procaccini diluait la sienne de façon à n'y laisser que quelques milliers de colonies par centimètre cube et exposait la dilution au soleil dans des vases de 30 litres, en verre, l'un transparent, l'autre entièrement recouvert d'une enve-

1. Influence de la lumière solaire sur les eaux d'égout. (*Annali dell' Instituto d'Igiene sperim.*, t. III, fasc. IV, 1893.)

loppe opaque et laissé à côté du premier. Une journée de soleil a d'ordinaire raison, dans ces conditions assez voisines de celles de la pratique, de tous les germes présents dans l'eau insolée. Il est vrai qu'il s'agit du soleil de Naples, mais nous allons trouver des résultats du même ordre à Munich.

Là, le procédé expérimental était différent. On a enfoncé à des profondeurs différentes, dans le lac de Starnberg, des boîtes de Pétri contenant une couche de gélatine ensemencée, munies d'un couvercle découpé, et protégées par une bande circulaire de caoutchouc contre la pénétration de l'eau. Après quatre heures et demie d'exposition par une belle journée de septembre, on les a rapportées au laboratoire et on a constaté que, jusqu'à $1^m,60$ de profondeur, la partie éclairée de la plaque de gélatine ne donnait aucune colonie, alors qu'il y en avait beaucoup sur la partie qu'on avait laissée dans l'obscurité. Jusqu'à 3 mètres, il y avait encore une différence entre la partie illuminée et l'autre. Il faut ajouter que l'eau du lac n'était pas parfaitement claire, remuée qu'elle était superficiellement par le passage continuel des bateaux à vapeur au voisinage de la station où avait été installée l'expérience, qu'il eût évidemment mieux valu faire sur une barque, au milieu du lac. Quoi qu'il en soit, on voit que l'action solaire s'étend jusqu'à une certaine profondeur. M. Procaccini n'a pas constaté qu'elle descendît aussi bas, mais il opérait sans doute avec des eaux plus troubles ou plus chargées de matières organiques.

Enfin Buchner a tenu à étendre ces observations aux eaux de fleuves. Si quelques heures d'insolation, s'est-il dit, suffisent à stériliser jusque dans les profondeurs une eau chargée de germes, en prélevant de l'eau en un point convenablement choisi d'un fleuve à débit régulier, on doit y trouver un minimum de germes vivants à la fin de la journée, un maximum à la fin de la nuit. L'expérience a été faite sur les eaux de l'Isar, prises à 10 kilomètres en amont de Munich, pour éviter l'influence de la variabilité dans les heures de déversement des eaux d'égout : elle a donné, en septembre, par une température moyenne de 7 à 8° R., les nombres suivants :

Heures de la prise d'essai.		Colonies par c. c.
6 h. 30	du soir	160
8 h. 45	—	5
11 h. »	—	8
12 h. »	—	107
1 h. 45	du matin	380
3 h. »	—	460
4 h. »	—	520
5 h. »	—	510
h. 15	—	250

D'autres expériences, faites dans les mêmes conditions, ont donné des résultats analogues, et tout cela témoigne, comme on voit, d'une intervention active de la lumière solaire pour la purification des eaux qui courent ou qui séjournent à la surface du globe.

Nul doute que cette destruction continue des germes ne s'accompagne de l'atténuation de ceux qui sont virulents. M. le Dr Palermo a précisément étudié l'action de la lumière solaire sur la virulence des bacilles du choléra [1], en exposant au soleil des cultures de ces bacilles, après les avoir protégées par un bain d'eau courante contre une élévation trop forte de température. Il a ainsi constaté que tous les cobayes inoculés avec les cultures laissées à l'obscurité, ou exposées au soleil moins de trois heures, mouraient dans le même temps, tandis qu'ils survivaient quand la culture avait subi une exposition de 3 h. 30, 4 heures et 4 h. 30. A ce moment-là, les bacilles n'étaient pas encore morts, et même ne semblaient pas diminués comme nombre, mais leur virulence avait baissé d'une façon évidente.

En recommençant les mêmes essais avec des cultures de vibrion cholérique diluées dans l'eau, il a vu aussi que la perte de virulence au soleil était d'autant plus rapide que la dilution était plus grande, et que ces cultures, devenues inoffensives, n'en avaient pas moins conservé leur pouvoir immunisant. Ce fait présente évidemment, au point de vue de l'hygiène, un intérêt capital, car si des déjections cholériques envoyées dans un ruisseau s'y atténuent et, injectées, deviennent protectrices vis-à-vis de l'inoculation intra-péritonéale du bacille du choléra, il est possible que bues, elles deviennent protectrices aussi contre l'ingestion de bacilles cholériques virulents, et cette notion apporterait évidemment un trouble profond dans les idées que nous nous faisons aujourd'hui de l'indispensable pureté des eaux de boisson.

Quoi qu'il en soit, l'action de la lumière solaire, à laquelle on est en droit d'attribuer une influence hygiénique si considérable dans le monde vivant, nous apparaît comme de premier ordre pour la question que nous étudions, de l'auto-dépuration des eaux de fleuve ou de rivière. Sans doute elle ne fait pas tout, et ne s'exerce pas indifféremment sur toutes les espèces de microbes. Il y en a même qu'elle favorise. Telles sont les bactéries purpurines étudiées par Engelmann, les *beggiatoa roseopersicina* de MM. Lankester et Zopf. Peut-être même y a-t-il des espèces photophobes qui peuvent, dans certaines conditions, devenir photophiles en se pliant aux conditions d'existence qu'on leur fait. Ce qui semblerait l'indiquer, ce sont précisément quelques expériences de Buchner sur le *B. pyocyaneus*, dans lesquelles on voit que ce bacille, après avoir diminué de nombre dans une eau exposée au

1. *Annali dell' Instituto d'Igiene sperimentale*, t. III, fasc. IV, 1893.

soleil, peut s'y multiplier à nouveau quand l'insolation continue. C'est ainsi qu'on trouve, à la page 184 du mémoire de M. Buchner, une expérience dans laquelle sur 46,600 germes de *B. pyocyaneus* par c. c., il n'en restait que 4 après un jour d'insolation; mais on en trouvait 39 après deux jours, et 1,800 après trois jours. L'insolation avait été directe, mais faite dans une chambre et devant une fenêtre close. Il y avait évidemment adaptation à la lumière dans cette expérience, et beaucoup de bactéries colorées ou de bactéries sécrétant des matières oxydables, et par là protectrices, doivent se trouver dans le même cas.

Le mécanisme de la stérilisation solaire mériterait en effet d'être étudié de près. Nous n'avons encore sur ce point que le récent travail de M. Richardson[1], où on voit que la lumière stérilise parfois les liquides en y amenant la formation d'un peu d'eau oxygénée, dont les pouvoirs antiseptiques sont bien connus. Cette suroxydation de l'eau n'est pas un phénomène général; elle dépend de la constitution du liquide, de la *qualité* de sa matière organique, et peut-être pourrait-on trouver là une explication de ces faits, contradictoires seulement en apparence, dans lesquels on voit l'action stérilisante de la lumière du soleil s'adresser tantôt à la spore, tantôt au milieu de culture. La question est encore trop obscure pour que je songe à l'aborder ici. Je me contente de faire remarquer en terminant l'infinie complication du mécanisme qui préside à la destruction des germes dans l'économie générale du monde : actions physiques, actions chimiques, quantité et qualité des germes et de la matière organique, température, degré d'aération, actions de diastases, de toxines, concurrences vitales, tout entre en jeu. A chaque instant autour de nous, dans la plus petite parcelle de terre comme dans la moindre goutte d'eau, la mort et la vie sont aux prises, chacune avec un ensemble de moyens auprès desquels l'outillage de nos armées et de nos flottes est chose grossière ; c'est par millions que meurent ou naissent en quelques heures des êtres qui peuvent nous être bienveillants ou hostiles, et vis-à-vis de ces batailles invisibles, qui peuvent avoir sur notre destinée une influence plus grande que la plus éclatante de nos défaites et de nos victoires, nous sommes restés jusqu'ici ignorants et indifférents. Il est temps que la science prenne possession de ces domaines inexplorés, riches en forces naturelles que nous avons jusqu'ici laissées agir à leur guise, et dont un peu d'ordre et de discipline centuplera facilement la puissance.

DUCLAUX.

1. L'action de la lumière pour préserver de la putréfaction en déterminant la formation d'eau oxygénée. (*Journal of the chemical Society*, sept. 1893.)

DERNIERS TRAVAUX

SUR L'INFLUENZA

WEICHSELBAUM. Contribution à l'étiologie et à l'anatomie pathologique de l'influenza, *Wiener klin. Wochenschr.*, nos 32 et 33. — HUBER. Sur le bacille de l'influenza. *Zeitschr. f. Hyg.* t. XIII. — BORCHARDT. Recherches sur le bacille de Pfeiffer. *Berl. klin. Wochenschr.*, janvier 1894. — KLEIN. Rapport sur l'influenza. *Local government Board*, *further reports*, 1889-1892.

Depuis la publication du travail de M. Pfeiffer (voir ces *Annales*, t. VII), il n'a paru qu'un petit nombre de mémoires, qui tous confirment la découverte de ce savant sur le bacille de l'influenza. Nous résumerons ici ceux de MM. Weichselbaum, Huber, Borchardt et Klein.

M. Weichselbaum résume dans deux articles ses études commencées aussitôt après la découverte de M. Pfeiffer, et qui ne s'accordaient pas au début avec elle. Ainsi l'examen microscopique montrait plus souvent les diplocoques de la pneumonie que les bacilles de l'influenza, et les ensemencements des sécrétions des malades restaient stériles ou donnaient des colonies d'autres microbes que ceux du bacille de Pfeiffer. Par contre, dans son second article, M. Weichselbaum est d'accord avec M. Pfeiffer non seulement sur la description de l'aspect général de ce microbe, mais aussi sur sa présence et sur sa distribution dans les tissus lésés, sur son mode de coloration, et sur la difficulté d'en obtenir des passages successifs dans les milieux artificiels. Il explique son désaccord primitif avec M. Pfeiffer par le fait qu'il n'avait observé d'abord que des cas d'influenza très compliqués, et le plus souvent par la pneumonie. D'après lui, l'organisme atteint par l'influenza devient très favorable au développement du pneumocoque. Il lui est arrivé d'observer ces coccus même dans des cas typiques d'influenza.

Dans ces recherches anatomiques sur les morts de l'influenza, M. Weischselbaum obtint aussi des résultats analogues à ceux de M. Pfeiffer et put également constater que le virus de l'influenza provoque non seulement la bronchite, mais une pneumonie lobulaire. La bronchite de l'influenza se caractérise surtout par l'inflammation

non seulement des petites, mais aussi des grandes ramifications bronchiales. De plus, les sécrétions y sont très épaisses et abondantes. Quant à la cause de l'inflammation purulente des cavités nasales, la question reste ouverte. On ne sait pas encore si c'est au microbe de l'influenza qu'on doit l'attribuer, ou si elle est une simple complication de la maladie. M. Weichselbaum a toujours observé, dans les sécrétions de cette inflammation, des pneumocoques typiques. Dans la moitié des cas, il a trouvé des microbes très semblables, mais non identiques aux bacilles de Pfeiffer.

M. Huber a fait des recherches bactériologiques sur l'influenza qui pendant l'épidémie de 1893 sévissait dans les régiments prussiens. Des vingt cas observés, douze se rapportaient à la forme catarrhale chronique[1], et huit à l'influenza catarrhale aiguë. Il examinait les crachats sur des préparations étalées (colorées avec la fuchsine de Ziel) et faisait aussi, avec eux, des ensemencements sur de la gélose enduite de sang. (Pfeiffer).

Toutes ses observations sont complètement d'accord avec celles de M. Pfeiffer.

Ainsi : 1° Les préparations microscopiques contenaient une grande quantité de bacilles de Pfeiffer. Dans cinq cas sur vingt seulement, ces derniers faisaient défaut ;

2° Les ensemencements donnèrent des cultures pures du bacille de l'influenza, et les colonies, comme celles décrites par M. Pfeiffer, avaient l'aspect de petites gouttes incolores et transparentes, isolées, ne pouvant être distinctement vues qu'avec la loupe;

3° Toutes les tentatives de faire des passages de ces colonies sur les milieux nutritifs ordinaires (bouillon, gélatine, gélose, gélose glycérinée) sont restées infructueuses ;

4° L'ensemencement du sang des malades a toujours été infructueux. Ce fait conduit M. Huber à conclure, avec Pfeiffer [2], que l'état morbide général des malades de l'influenza est provoqué par l'intoxication plutôt que par l'infection ;

5° Enfin, M. Huber, comme M. Pfeiffer, n'a trouvé les bacilles de l'influenza dans aucune autre maladie.

1. D'après M. Pfeiffer, dans l'influenza catarrhale chronique, la maladie siège dans les bronches, tandis que dans l'influenza catarrhale aiguë, elle se localise dans les cavités nasales et celle du pharynx. Dans la première forme de la maladie, les crachats sont d'une couleur caractéristique jaune verdâtre et contiennent presque exclusivement les bacilles de l'influenza; dans la forme aiguë, les malades sécrètent des crachats visqueux, écumeux, renfermant différents microbes qui masquent la présence du microbe typique.

2. M. Pfeiffer ne regarde que comme accidentelle la présence du bacille de 'influenza dans le sang des malades.

Tout en reconnaissant les avantages de la gélose-sanguine de M. Pfeiffer comme milieu de culture, M. Huber en trouve la préparation peu commode. Il est difficile de retirer le sang et de le transporter purement sur la gélose. Comme c'est l'hémoglobine du sang qui fournit à la nutrition des bacilles (Pfeiffer), M. Huber eut l'idée de se servir de la « préparation d'hémoglobine » du Dr Hommels. C'est un liquide trouble, d'une couleur rouge foncé, aromatique, et ayant une réaction neutre. Pour le stériliser M. Huber le chauffait à 100°. Il se coagule, prend une couleur brune, devient compact et opaque. Mais on peut éviter ces inconvénients; en ajoutant de la potasse jusqu'à réaction très alcaline, on empêche la coagulation, et en filtrant on éloigne les matières albuminoïdes qui se sont précipitées après le chauffage. On obtient alors un liquide stérile et transparent, qui, ajouté à la gélose liquide[1], donne un milieu nutritif solide et transparent, d'une couleur rouge. Les bacilles de Pfeiffer y poussent abondamment, et peuvent donner plusieurs passages (jusqu'à la septième génération). Leur développement sur ce milieu est bien plus lent que sur la gélose sanguine de M. Pfeiffer. Ce n'est que très rarement qu'ils commencent à germer après un ou deux jours. Bien plus souvent c'est après le troisième jour, ou quelquefois ce n'est que le huitième jour, qu'on commence à observer les colonies typiques. Par contre, la durée de leur vie est bien plus longue dans ces conditions. Tandis que sur la gélose sanguine les colonies meurent du quatorze au dix-huitième jour, elles restent encore vivantes après trente-huit ou quarante jours sur la gélose à l'hémoglobine. Sur ce milieu, les bacilles de Pfeiffer, bien que très aérobies, se développent même après un ensemencement par piqûre. Dans ces conditions leur développement est très lent, commence à peine le cinquième ou sixième jour, et fournit une strie toute foncée au milieu de la gélose rouge. La durée de la vie des bacilles de l'influenza est encore plus grande dans ces cultures. Elles est de trente-cinq à quarante-sept et quelquefois de soixante-sept jours. La couleur rouge de cette gélose a permis un examen spectral, qui démontra que la quantité d'oxygène y est insignifiante, et que c'est évidemment (comme l'avait dit M. Pfeiffer), par le fer qu'il contient que l'hémoglobine est indispensable pour la vie du bacille de l'influenza.

Le bouillon additionné de la même hémoglobine peut également servir de milieu nutritif.

M. Huber reconnaît à la découverte de M. Pfeiffer non seulement

1. On refroidit la gélose jusqu'à 50°-60°, car des températures plus élevées auraient pu coaguler de nouveau l'hématogène à la suite de la diminution de l'alcalinité.

un intérêt purement scientifique, mais encore un intérêt pratique. Elle peut permettre le diagnostic dans les cas difficiles. Ainsi, M. Huber en a vu de tellement compliqués par des catarrhes des intestins et de l'estomac, ou bien encore par des symptômes d'une vraie rougeole, que l'analyse bactériologique a seule été capable de préciser la cause réelle de la maladie.

Pour ce diagnostic il est préférable de se servir de gélose sanguine comme milieu nutritif, parce que les bacilles de l'influenza y poussent plus vite que sur la gélose à l'hémoglobine.

M. Borchardt a étudié très soigneusement les crachats de l'influenza au point de vue macroscopique et microscopique. Leurs propriétés varient beaucoup selon le stade de la maladie et selon la localisation du processus morbide. Dans la grande majorité des cas, ils sont muqueux, purulents et d'une couleur gris vert. Ils sont sécrétés en masses compactes et abondantes. Les crachats purulents homogènes sont également très fréquents ; ils sont d'une couleur jaune vert, ou, ce qui n'est pas rare non plus, d'une couleur blanche et brillante. On ne rencontre que très rarement des crachats couleur de rouille. Ce genre de crachats s'observe dans les cas où l'influenza est compliquée par la pneumonie. Mais il est facile de distinguer ces crachats de ceux d'une pneumonie fibrineuse, car il se distinguent macroscopiquement par leur caractère trouble, et au microscope par la prédominance des globules blancs sur les globules rouges de sang.

M. Borchardt a trouvé les bacilles de l'influenza dans trente-cinq cas sur cinquante observés. A côté d'eux on trouvait d'autres microbes, mais les premiers étaient toujours prédominants ou même souvent en culture pure. Ces bacilles n'ont manqué que dans quelques cas d'influenza typique. Peut-être cela tenait-il aux conditions dans lesquelles les recherches furent faites. Il faut noter qu'après l'acmé de la maladie les bacilles font presque complètement défaut. Dans de tels cas il faut soigneusement examiner les crachats pour pouvoir juger définitivement de la présence des bacilles. Ordinairement on ne les y trouve que pendant une huitaine de jours, mais dans un cas on les a observés après vingt-huit jours et presque en culture pure.

M. Borchardt a aussi trouvé assez souvent des bacilles très semblables aux véritables bacilles de Pfeiffer, mais plus grands et se colorant (contrairement à ces derniers) plus fortement au milieu qu'aux bouts. Ils poussent bien sur la gélose sanguine ; leurs colonies sont opaques et d'une structure granuleuse ; elles deviennent transparentes dans la seconde génération et renferment beaucoup de bacilles en faux filaments. On ne sait pas encore si ces bacilles sont identiques

à ceux de la pseudo-influenza décrits par M. Pfeiffer, ou s'ils appartiennent à une autre espèce de microbes.

Comme M. Huber, M. Borchardt reconnaît le rôle important du bacille de Pfeiffer pour le diagnostic. Ainsi il cite le cas embarrassant d'une malade qui avait la rate considérablement tuméfiée, un léger catarrhe pulmonaire et un état général très déprimé. Elle n'expectorait pas les premiers jours. Le diagnostic oscillait entre l'influenza et la fièvre typhoïde. Le neuvième jour de son entrée à l'hôpital, la malade expectora une petite quantité de crachats muqueux, dont l'examen microscopique fit porter le diagnostic d'influenza. La justesse de ce diagnostic fut confirmée par la marche ultérieure de la maladie.

Comme l'influenza typique débute habituellement par une forte fièvre, précédant même l'infection des voies respiratoires, M. Klein conclut *a priori* que c'est surtout dans le sang qu'on doit trouver en abondance le virus de l'influenza. C'est donc par l'examen du sang qu'il commença ses expériences. Il a observé le sang de quarante-trois malades, prélevé sur la dernière phalange du doigt et étudié aux diverses périodes de la maladie. Il faisait avec ce sang des préparations étalées et des ensemencements; comme matière colorante il se servait du bleu de méthylène phéniqué, ou, plus souvent encore, il employait la méthode de *Canon* (40 grammes d'une solution aqueuse concentrée de bleu de méthylène additionnée de 20 grammes d'une solution alcoolique à 1/2 0/0 d'éosine et de 40 grammes d'eau distillée). Il faut laisser les préparations pendant quelques heures dans ce bain colorant à la température de 37°, ou toute la nuit à la température ordinaire.

L'examen du sang au microscope ainsi que dans les cultures donna des résultats complètement négatifs dans trente-sept cas sur quarante-trois cas observés. Dans les six autres cas, l'ensemencement fut également stérile, mais dans les préparations étalées on trouvait des bacilles de *Pfeiffer*. Leur quantité était très variable; ainsi, dans un cas les bacilles étaient nombreux, tandis que dans les autres cas ils étaient en nombre insignifiant ou minime. La conclusion que M. Klein tire de ces constatations est que la présence des bacilles dans le sang n'est pas un phénomène essentiel à la maladie, contrairement à ce qui est le cas pour beaucoup d'autres maladies infectieuses.

Les résultats négatifs des ensemencements, dans les cas où l'on trouvait des bacilles dans les préparations étalées, peuvent être expliqués par la supposition que les bacilles contenus dans le sang étaient morts.

M. Klein examina aussi les expectorations bronchiales des malades

de l'influenza, et obtint des résultats analogues à ceux de M. Pfeiffer. On doit donc conclure que c'est dans les bronches et dans les voies respiratoires en général que la maladie se localise. M Klein remarque à cette occasion que, dans les cas d'influenza aiguë accompagnée d'expectorations bronchiales, les sécrétions de la muqueuse nasale et pharyngée contiennent en abondance les bacilles de l'influenza. Dans ces cas il faut donc chercher ce microbe dans ces sécrétions et non dans les crachats bronchiaux. M. Huber avait fait la même observation.

Les recherches de M. Klein, sur les cultures du bacille de l'influenza sur différents milieux nutritifs, s'accordent aussi avec celles de M. Pfeiffer. Seulement M. Klein insiste beaucoup plus sur la croissance du bacille en faux filaments. Les cultures sur gélose et dans du bouillon présentent par exemple beaucoup de filaments entrelacés et noués par endroits. Il y en a dont la longueur est de plusieurs millimètres. Ils sont formés d'individus isolés placés bout à bout, et enveloppés d'une gaine commune qui constitue le faux filament. Dans les cultures jeunes, les filaments sont composés d'individus se colorant plus fortement aux pôles; dans les cultures anciennes (de quelques jours) les filaments sont dégénérés et privés, par endroits, de protoplasma; il ne reste plus guère que la gaine. Dans tous les filaments, M. Klein a vu des individus renflés, d'une forme sphérique ou ovale, et plus épais que le bacille typique. Les individus les plus épais ont très souvent une vacuole centrale. Le nombre de ces bacilles renflés est plus grand dans les cultures anciennes que dans les jeunes, et il est probable que ce sont des formes d'involution.

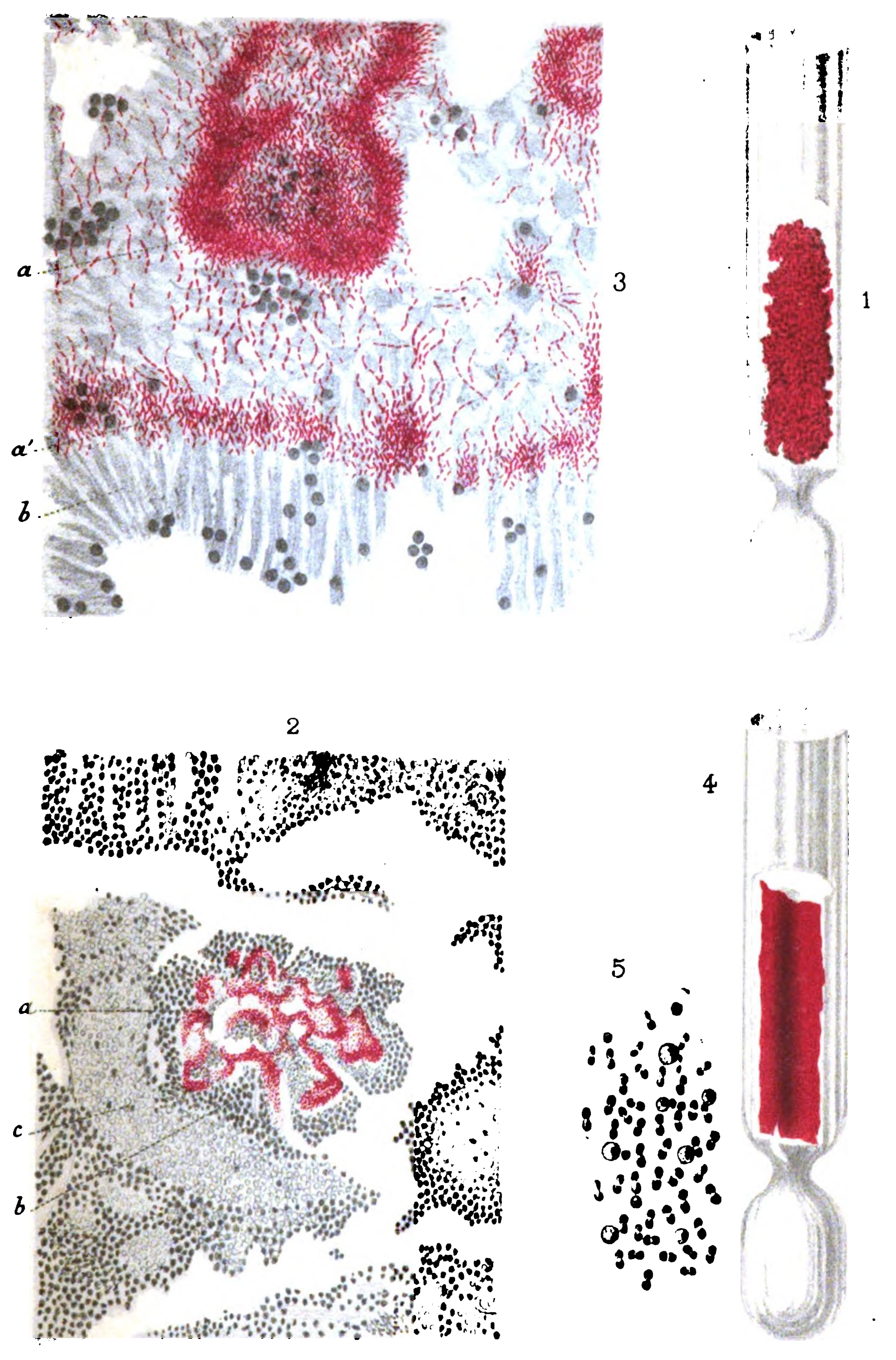
Les tentatives de M. Klein pour inoculer l'influenza à des singes et à des lapins sont restées infructueuses, et ses observations sur l'état général des animaux domestiques, ainsi que sur les singes et autres mammifères du Jardin d'acclimatation de Londres, pendant les épidémies de l'influenza, ont montré que ces animaux restent insensibles à cette maladie, qui est donc exclusivement humaine.

M. Klein termine son article en signalant l'intérêt qu'il y aurait à savoir si l'on trouve le bacille de l'influenza constamment et en grande abondance, dans des cas caractérisés, moins par les sécrétions morbides des bronches que par celles des muqueuses intestinales et autres. Il serait aussi important de chercher si le nombre des bacilles diminue dans ces cas avec l'affaiblissement et la fin de la maladie, comme cela s'observe dans les cas de l'influenza ordinaire.

TSI.

Le Gérant : G. MASSON.





V. Roussel del et lith.

Imp. A. Lafontaine & Fils Paris

8me ANNÉE AVRIL 1894. N° 4.

ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

ÉTUDES SUR LA FIÈVRE TYPHOIDE EXPÉRIMENTALE

PAR LE Dr JOSEPH SANARELLI
Docent d'hygiène (Rome)

(Travail du Laboratoire de M. E. Metchnikoff à l'Institut Pasteur)

DEUXIÈME MÉMOIRE

I

LA TOXINE TYPHIQUE

La fièvre typhoïde, telle qu'on peut l'étudier sur l'homme ou l'obtenir chez les animaux, présente un type de maladie si différent de tant d'autres, que, malgré les nombreuses recherches de ces derniers temps, son mécanisme biologique nous est presque entièrement inconnu.

Néanmoins, il faut y noter la disproportion entre la quantité de microbes trouvés dans les tissus et la gravité des effets morbides déterminés par eux. Cela fait croire à l'existence d'un poison, dont l'étude pourra peut-être éclaircir ce qui reste encore d'obscur dans la nature de la fièvre typhoïde.

Les premières études sur la toxine typhique remontent à M. *Brieger*[1], qui a extrait des cultures typhiques une base qu'il a appelée *typhotoxine*, et qui paraissait douée de grandes propriétés toxiques. Mais on sait aujourd'hui qu'il n'y a pas à compter avec les recherches de M. *Brieger*, et que ses *ptomaïnes* ne sont d'ordinaire que des produits de décomposition, dus au traitement que l'on fait subir à la substance albuminoïde

1. Weitere Untersuchungen über Ptomaine. Berlin, 1885.

ou aux poisons microbiques préexistants dans les cultures. Les travaux de M. *Salkowski*[1] et de MM. *Bouveret* et *Devic*[2], sur la peptotoxine de M. *Brieger*, ont très bien mis en lumière ce fait, en démontrant que l'évaporation des liquides albuminoïdes en présence d'acide chlorhydrique, et leur extraction consécutive avec l'alcool, sont déjà capables par elles-mêmes de produire artificiellement des corps considérés par M. *Brieger* comme des ptomaïnes.

D'un autre côté les détails que nous a donnés M. *Brieger* sur l'action physiologique de la *typhotoxine* ne présentent aucune analogie avec l'état morbide de la fièvre typhoïde expérimentale, et par conséquent la démonstration du poison typhique nous échappe encore entièrement.

Un travail plus récent de *Brieger* et *Fränkel*[3] nous donne à ce sujet quelques autres détails. En employant les mêmes méthodes analytiques que dans leurs recherches antérieures sur les toxines diphtériques, ces savants ont filtré des cultures de bacilles typhiques, concentrées au tiers dans le vide à 30°; après cela ils ont ajouté dix fois le volume d'alcool et quelques gouttes d'acide acétique.

Le précipité ainsi obtenu a été de nouveau dissous dans l'eau, saturé avec du sulfate d'ammoniaque, et dialysé. La partie dialysée se montra inactive sur les animaux ; celle qui était restée sur le dialyseur donna les réactions de l'albumine ordinaire et manifesta un pouvoir toxique assez faible. Les cobayes étaient peu sensibles à cette toxo-albumine, et les lapins mouraient après quelques jours, sans présenter aucunes lésions appréciables.

Comme il est facile de le comprendre, les résultats nous laissent encore loin de la solution du problème. Qu'était en elle-même, et pour combien comptait, dans le précipité complexe obtenu par MM. Brieger et Fränkel, la toxine typhique? C'est ce qu'il est impossible de dire.

Toutes les tentatives faites pour nous donner une idée de la nature chimique des poisons microbiques ont complètement échoué. Les méthodes ordinaires de la chimie sont évidemment

1. Uber das Peptotoxin (*Virchow's Archiv.*, 1891. Vol. 124, page 409).
2. Sur la tétanie d'origine gastrique (*Revue de médecine*, 1892, nos 1, 2).
3. Untersuchungen über Bacteriengifte (*Berliner Klinische Woch*, 1890. nos 11, 12).

trop énergiques pour pouvoir éviter la formation de produits artificiels ou la décomposition des poisons microbiques.

Il ne suffit d'ailleurs pas d'obtenir la mort d'un animal inoculé avec un de ces produits pour l'assimiler avec le poison spécifique. Il faut encore trouver des analogies entre les phénomènes d'intoxication expérimentale et la symptomatologie clinique de la forme morbide.

Or, jusqu'ici, l'emploi des réactifs chimiques a toujours fourni des composés qui non seulement ne représentaient pas des matières tout à fait pures, mais aussi avaient perdu la plus grande partie de leur nature et de leur activité.

Mieux vaut donc, pour le moment, s'en tenir à l'étude de la toxine typhique, telle qu'on la trouve dans les cultures du bacille d'Éberth dans les milieux nutritifs ordinaires. On sait depuis longtemps que les cultures typhiques, en dehors de la présence des microbes, produisent sur les animaux de tels effets toxiques que les premiers expérimentateurs ont attribué la mort des animaux inoculés avec les cultures du bacille d'Éberth, non à une infection, mais à une véritable intoxication, due aux produits solubles déjà élaborés par les microbes et existants dans le liquide de culture injecté.

Cependant le poison typhique, à la différence de celui que l'on obtient avec les agents de maladies vraiment toxiques, comme le tétanos et la diphtérie, ne tue qu'à forte dose, et, pour cela, il est d'une action très inconstante, peu favorable à nos études.

Il faut proscrire la méthode des inoculations, dans le péritoine ou dans les veines, de grandes quantités de culture stérilisées ou filtrées, car, de cette façon, on obtient la mort des animaux de la même manière qu'on l'obtiendrait avec des cultures stérilisées ou filtrées d'autres microbes de différente nature.

J'ai donc pensé que, pour avoir une bonne toxine typhique, il fallait avant tout se procurer un virus très actif, et j'ai déjà indiqué le moyen le plus commode d'atteindre ce but : après une grande quantité de passages du virus typhique à travers le péritoine des cobayes, j'étais arrivé à obtenir des cultures d'une grande virulence, qui tuaient rapidement les animaux à petites doses, même avec des injections sous-cutanées. J'ai utilisé ce liquide toxique.

Vers la moitié de septembre 1892, j'ai ensemencé deux ballons de bouillon glycériné à 2 0/0 avec quelques gouttes d'exsudat péritonéal provenant d'un cobaye, mort au bout de quelques heures d'infection typhique. Ces ballons ont été placés et gardés dans l'étuve à 37° pendant un mois environ, ensuite stérilisés et laissés en repos pendant huit mois à la température de la chambre. Puis on les a hermétiquement clos et mis à macérer pendant quelques jours à 60°.

Le liquide de culture s'était, après cela, divisé en deux couches parfaitement distinctes : la couche supérieure limpide, transparente et d'une couleur brunâtre ; l'autre, inférieure, composée d'une mince couche de microbes morts et déposés au fond.

Je décantai soigneusement le liquide de la couche supérieure, de manière à l'obtenir privé de tout germe, et j'en essayai le pouvoir toxique sur les animaux.

Ce pouvoir toxique ne provient pas seulement, on le sait, des sécrétions actives des microbes, mais aussi des matières qui restent dans leur cadavre et que la macération en peut extraire.

Cette idée, que M. *Cantani*[1] a énoncée le premier, a trouvé ensuite un appui dans les observations sur les toxines du tétanos et de la dipthérie, et dans les études de M. *Buchner*[2] sur les protéines.

Ainsi, on a vu que la quantité de poison dans les liquides de culture du tétanos et de la diphtérie ne croît pas proportionnellement au développement des microbes. Au commencement, c'est-à-dire au moment de la vie la plus active des microbes, le liquide de culture est acide et sans aucune propriété toxique. Plus tard, lorsque les bactéries ont cessé de se multiplier et se déposent au fond, le liquide devient alcalin et son pouvoir toxique augmente, dans une certaine mesure, avec la durée du séjour des microbes dans leur liquide de culture.

Cela démontre que la substance toxique se trouve renfermée dans le corps des microbes, et qu'elle en est extraite lentement par le liquide alcalin dans lequel ils sont à macérer.

La méthode que j'ai suivie pour obtenir la toxine typhique s'est inspirée de ce principe, et j'ai, de cette façon, évité tous les

1. Die Giftigkeit der Cholerabacillen *(Deutsche Med. Wochensch.*, 1886, n° 45*)*.
2. Uber eiterregende Stoffe in Bacterienzelle *(Berliner Klin. Wochensch.*, 1890, n°s 30-47*)*.

inconvénients que l'on rencontre en suivant les procédés habituels de filtration et de concentration des liquides de culture.

Cette toxine a été ensuite essayée sur le lapin, la souris, le cobaye et sur le singe.

ACTION DE LA TOXINE TYPHIQUE SUR LES LAPINS

Le virus typhique n'a agi sur les lapins que d'une manière très inconstante, et c'est pour cela que dans le cours de mes recherches précédentes sur la fièvre typhoïde expérimentale, j'ai été bientôt obligé d'éliminer ces animaux de mes études. Ce qui se vérifie pour le virus s'observe aussi pour la toxine typhique.

La sensibilité des lapins à l'action de la toxine typhique ne peut donner une idée de sa nature et de ses effets dans l'organisme. En employant des petits lapins de 700-1,000 grammes, la dose mortelle de ma toxine était ordinairement 1 c.c. par chaque 100 grammes du poids de l'animal.

Dans les cas mortels, peu après l'injection sous-cutanée de la toxine, les lapins commencent à avoir la respiration plus fréquente ; environ une heure après, ils ne se tiennent plus sur leurs pattes, et il se manifeste une parésie générale plus ou moins marquée : l'œil, alors, est éteint, et la marche impossible.

Pendant cet état de malaise très fort qui dure d'habitude jusqu'à la mort, les animaux peuvent parfois se remettre, en apparence, de façon à sembler complètement rétablis ; mais après trois, six ou douze heures, ils tombent dans des accès convulsifs, d'abord à longs intervalles, mais bientôt de plus en plus rapprochés, qui finissent par une mort subite.

Dans ces cas, la température du corps monte environ d'un degré pendant la première heure, mais pour redescendre ensuite avec rapidité et atteindre des limites d'autant plus basses qu'a été plus grande la dose de la toxine ou la durée de l'intoxication.

Dans un cas, un lapin est mort après trois heures seulement, sans que sa température ait eu le temps de descendre jusqu'à 38°, après avoir atteint, au commencement, de 40°6 à 41°6' ; dans un autre cas, le lapin est mort au bout de dix-huit heures : sa température était descendue et s'était maintenue pendant quatre heures de suite entre 33° et 34°. Tant dans le premier cas que dans le second, on ne retrouve presque jamais rien de remar-

quable à l'autopsie : les organes abdominaux sont, en général, anémiés, et les masses intestinales, pâles et molles, ne laissent apparaître qu'un contenu quelque peu diarrhéique ; on n'y trouve aucune des particularités intéressantes, telles que la congestion de la muqueuse, l'infiltration des plaques de Peyer, etc., etc., qui constituent, au contraire, les symptômes prédominants dans la fièvre typhoïde expérimentale des cobayes. Mais en laissant de côté cette absence, chez les lapins, des caractères qui rapprochent l'infection des cobayes de l'infection humaine, reste encore à éclaircir le problème de la quantité de poison. Quelques lapins succombent à une injection sous-cutanée de 1 c.c. pour 100 grammes de leur poids, tandis que d'autres, au contraire, même après l'inoculation de 3 et 4 c.c. 0/0, peuvent survivre longtemps. Entre autres, je citerai un lapin, de 770 grammes, qui avait reçu une injection de 8 c. c. de toxine, et ne mourut qu'après douze jours de cachexie, sans présenter aucune lésion anatomique, excepté une dénutrition et une anémie très remarquables de tous les organes.

Lorsque la dose de toxine n'est pas rapidement mortelle, la température du corps monte pendant la première journée jusqu'à deux degrés au-dessus de la normale, et dans les jours suivants revient, en oscillant lentement, à la température initiale. Cependant, l'animal paraît toujours malade, les oscillations thermiques sont très irrégulières et plus étendues que celles que l'on vérifie habituellement dans le lapin ; plus tard, enfin, se manifestent des diarrhées intestinales qui sont la prémonition infaillible d'une mort prochaine.

Mais, malgré l'intérêt présenté par des phénomènes toxiques si évidents, l'étude et l'interprétation en restent assez difficiles, et j'ai cru mieux faire de recourir à d'autres espèces d'animaux.

ACTION DE LA TOXINE TYPHIQUE SUR LES SOURIS BLANCHES

Les souris blanches sont assez sensibles à l'action du poison typhique, mais, comme les lapins, elles présentent aussi quelquefois des différences individuelles assez remarquables.

La quantité minima mortelle de ma toxine, pour les souris du poids de 18-20 grammes, était de 1 c. c. sous la peau, et de 0,2 c. c. dans le péritoine, dose, comme l'on voit, relativement

énorme si on compare à la dose mortelle que nous avons trouvée nécessaire pour le lapin, et que nous verrons ensuite suffisante pour les cobayes et le singe. Déjà trente minutes après l'injection sous-cutanée de 1 c. c. de toxine, les souris commencent à manifester des signes évidents de souffrance, elles sont très excitables, et on ne peut les toucher sans déterminer des manifestations d'une sensibilité exagérée.

Peu à peu apparaît une forte météorisation abdominale accompagnée d'une grande sensibilité douloureuse locale; alors les animaux commencent à s'assoupir et restent sans mouvement avec les yeux fermés, se refroidissent rapidement, et meurent après quatre, huit, seize heures.

Si la dose du poison est supérieure à 1 c. c., on peut même obtenir la mort après une heure.

A l'autopsie on constate une légère hyperémie des viscères abdominaux; la rate est toujours beaucoup grossie et le péritoine est rempli d'une grande quantité d'exsudat limpide, sans cellules ni microbes.

L'inoculation intra-péritonéale est beaucoup plus grave, mais d'autant moins certaine. La dose de 1 c. c. tue en moins d'une heure, celle de 0,2 c. c. tue d'ordinaire en douze, vingt-quatre heures.

L'examen anatomique est à peu près identique dans les deux cas, et comme j'ai souvent observé des différences individuelles assez notables, je n'ai pas cru opportun de choisir l'intoxication de ces animaux comme exemple démonstratif du poison typhique.

ACTION DE LA TOXINE TYPHIQUE SUR LES COBAYES

Les cobayes sont effectivement les meilleurs réactifs tant pour le virus que pour le poison typhique.

La dose mortelle minima était 1,5 c. c. par 100 grammes du poids du corps par la voie sous-cutanée : c'est la dose mortelle pour les cobayes avec les toxines du vibrion aviaire, qui sont comptées parmi les plus actives et celles qui se prêtent le mieux à l'étude des intoxications bactériennes expérimentales.

De plus, à l'encontre de ce que l'on observe avec les lapins et les souris, l'action du poison typhique se manifeste chez les

cobayes avec une constance qui rend aisée l'étude minutieuse des effets de l'intensité et de la durée de l'intoxication sur la nature et l'extension des lésions anatomiques, qui présentent toujours, avec les cobayes, un type bien défini, entièrement identique à ce que l'on obtient dans la fièvre typhoïde de laboratoire.

Parmi les conséquences de l'intoxication typhique sur les cobayes, nous devons prendre en considération : 1° la période de la maladie; 2° le cours de la température; 3° les symptômes morbides; 4° les lésions anatomiques; 5° le mécanisme biologique de l'intoxication.

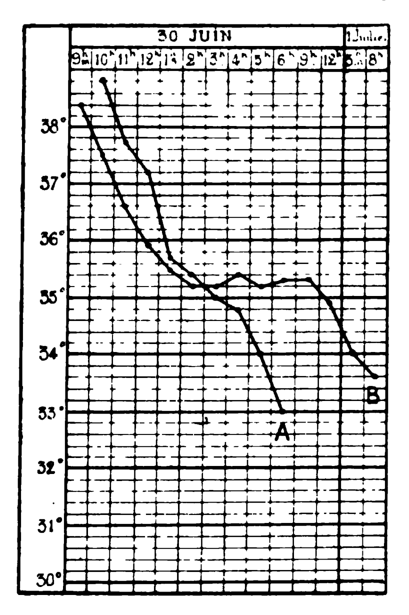
1° On entend, par période de la maladie provoquée par la toxine typhique, le laps de temps qui court entre le moment de l'inoculation et la mort de l'animal. Cette période est constamment et régulièrement en rapport immédiat avec la quantité du poison. La dose de 1,5 c. c. 0/0 du poids, injectée sous la peau, est la dose minima nécessaire pour provoquer la mort, laquelle survient dans les dix, vingt heures environ ; si cette dose vient à être portée à 2 0/0 et même plus, la mort de l'animal survient aussi en un temps inversement proportionnel, et on peut l'obtenir même en huit, dix heures.

L'inoculation dans le péritoine est au contraire beaucoup moins sûre : j'ai souvent trouvé qu'une dose de toxine, capable de tuer infailliblement les cobayes par la voie sous-cutanée, peut rester sans aucun effet lorsqu'on l'introduit dans la cavité péritonéale. Pour le moment, l'explication du phénomène nous échappe entièrement, bien que le même fait se retrouve (M. *Roux*) avec le poison de la diphtérie. C'est à cause de cela que j'ai toujours évité, dans le cours de mes expériences, les inoculations dans le péritoine et dans les veines, dont l'effet m'a paru quelque peu inconstant.

2° Au sujet de la température, je ne pourrais que répéter ce que j'ai déjà eu l'occasion de dire sur les courbes thermiques de l'infection typhique. L'introduction de la toxine typhique dans l'organisme des cobayes détermine immédiatement une hypothermie plus ou moins intense, plus ou moins rapide, selon la dose inoculée, mais régulière et procédant presque sans interruption jusqu'au moment de la mort. Tel est le cas plus commun, c'est-à-dire lorsqu'on injecte 1, 5 c.c. 0/0 du poids : la mort de l'animal survient en dix à seize heures.

Quand la dose est un peu moindre (1 0/0 du poids), la mort est plus tardive, vingt-quatre heures environ, et la ligne thermique, qui d'abord est une courbe rapidement décroissante, présente à des périodes déterminées quelques arrêts plus ou moins longs, suivis d'une nouvelle chute jusqu'au moment de la mort.

Donc, l'unique différence remarquable entre les courbes thermiques de l'infection et de l'intoxication typhiques consiste



I. Courbes thermiques de l'*intoxication* typhique chez les cobayes.

A. Cobaye de 270 grammes. A 10 heures du matin, injection sous-cutanée de 4,1 c.c. de toxine (1,5 c.c. par 100 grammes).

B. Cobaye de 350 grammes. A 9 heures du matin, injection sous-cutanée de 3,5 c.c. de toxine (1 0/0).

en ceci que, dans le premier cas, on observe toujours une hyperthermie initiale de courte durée, laquelle manque entièrement dans le second cas.

On peut aussi obtenir cette hyperthermie avec l'inoculation de la toxine seule, en ayant soin d'en employer de petites doses qui ne soient pas mortelles. Nous devons donc conclure que, dans l'infection typhique, les réactions thermiques représentent le pouvoir de résistance de l'organisme dans sa lutte contre la maladie.

Cette connaissance est donc d'un intérêt pratique très grand,

car elle est intimement liée au problème, aujourd'hui si discuté, de la thérapeutique antithermique.

3° Mais les symptômes morbides, que la toxine typhique détermine dans les cobayes, sont bien plus importants et caractéristiques que les modifications thermiques, car ces symptômes, étant tout à fait identiques à ceux que l'on observe dans l'infection typhique, reproduisent exactement, avec les lésions anatomiques, le tableau typique de la fièvre typhoïde expérimentale.

Ces signes morbides commencent environ une heure après l'inoculation du liquide toxique, et se manifestent par une forte météorisation abdominale, accompagnée d'une extrême sensibilité douloureuse. Les cobayes, d'habitude si vifs, se tiennent immobiles, courbent le dos, étalent les pattes et cherchent à éviter tout contact avec les objets environnants : leur expression est très singulière, car chacun de leurs mouvements, chaque regard de leurs yeux est marqué par cette grande et dominante préoccupation. En touchant même doucement leur ventre, ordinairement très distendu, on provoque toujours des signes d'une souffrance très grande ; l'introduction de la boule du thermomètre dans leur rectum est excessivement malaisée parce qu'elle provoque des douleurs insupportables ; les animaux sont excitables, ils commencent à se plaindre et tout en eux démontre que la cavité abdominale devient le siège d'une lésion importante.

Dans les cas à cours plus rapide, cet état initial d'extrême souffrance et d'excitabilité, qui dure de quatre à cinq heures, est suivi d'une période de calme relatif. Les animaux sont accablés et tiennent les yeux mi-clos, en proie à un tremblement presque continuel; le ventre est toujours fortement météorisé et très sensible ; par le rectum commence à sortir une mucosité jaunâtre et sanguinolente. Dans les cas de plus longue durée se manifeste une véritable diarrhée, parfois hémorragique, qui continue jusqu'à la mort.

Cette dernière est précédée par une troisième période dans laquelle les animaux sont complètement inertes et paralytiques, les yeux sont fermés et sans réaction cornéale, la respiration devient périodique, la météorisation abdominale disparaît peu à peu, les parois du ventre deviennent molles et moins sensibles ; de temps en temps le corps donne signe de vie par de violentes

contractions musculaires. Mais bientôt la paralysie générale envahit les muscles respiratoires, l'asphyxie apparaît et la mort est imminente.

4° L'autopsie, faite immédiatement après la mort, révèle dans la cavité péritonéale une quantité plus ou moins grande d'exsudat toujours riche en leucocytes, souvent aussi trouble et rempli de flocons fibrino-purulents. La rate présente ordinairement une certaine augmentation de volume; elle est aussi congestionnée, friable, et recouverte, comme le foie, de minces mailles d'exsudat. Toute la masse intestinale est fortement congestionnée et hémorragique; les parois de l'intestin grêle, en particulier, se montrent dilatées, efflanquées, amincies, et complètement infiltrées de sang; le contenu apparaît, même par transparence, diarrhéique et sanguinolent; la surface de la muqueuse est rouge, et les plaques lymphatiques infiltrées et congestionnées ressortent nettement par leur aspect et leur grandeur.

L'estomac, aussi, est fortement hyperémié et l'arborescence vasculaire de la grande courbure apparaît très congestionnée.

Les autres viscères abdominaux présentent aussi des lésions plus ou moins graves, et de la même nature. Les reins, d'habitude, ne sont en aucune façon atteints, mais les capsules surrénales présentent des congestions intenses et des taches ecchymotiques; la vessie urinaire est toujours vide et rétrécie; l'utérus est aussi le siège d'un processus congestif très grave et étendu.

Ordinairement, on ne trouve rien de remarquable dans la cavité du thorax; mais, en examinant attentivement le larynx et la trachée, on observe souvent un léger état congestif, accompagné quelquefois d'une sécrétion muqueuse localisée presque exclusivement à la luette.

Tel est dans son ensemble le tableau général de l'intoxication typique des cobayes. Comme on voit, il correspond au tableau que j'ai déjà décrit de la fièvre typhoïde dans ces mêmes animaux. Il présente la même symptomatologie et les mêmes lésions anatomiques; donc, non seulement je dois considérer le liquide toxique, préparé par moi, comme représentant la véritable toxine typhique, mais je dois encore lui attribuer toutes les altérations qui jusqu'à présent étaient attribuées, en grande partie, à des localisations électives du même virus dans l'organisme.

ACTION DE LA TOXINE TYPHIQUE SUR LE SINGE

Les effets observés sur les cobayes, si intéressants par les multiples analogies qu'ils présentent avec certaines formes cliniques et anatomiques de la fièvre typhoïde humaine, m'ont poussé naturellement à expérimenter la toxine typhique sur le singe.

Un petit singe cercopithèque de 910 grammes a été inoculé le 13 septembre, sous la peau du dos, avec 3 c. c. du liquide toxique. Environ trois heures après, la température rectale était montée de 39°4′ à 40°8′, et l'animal commença bientôt à manifester des signes évidents d'un grand malaise.

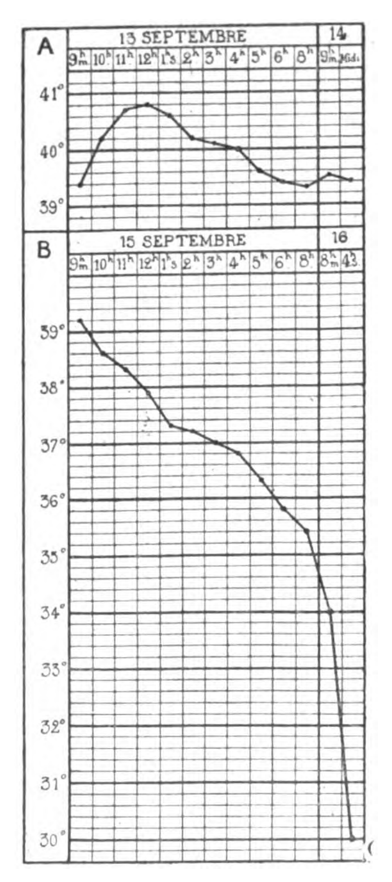
Ces signes consistaient en un accablement général : le singe, qui d'habitude était très vif, restait blotti dans un coin de la cage, avec la tête repliée sur lui-même, les bras entrelacés sur le ventre, et dans une attitude qui témoignait de troubles douloureux dans les viscères abdominaux. Pendant toute la journée il refusa la nourriture ordinaire, et ne manifesta qu'une soif très ardente qu'il cherchait à éteindre sans relâche. Il resta presque toujours immobile dans la même position, de laquelle il n'était dérangé que pendant le temps nécessaire pour prendre la température du rectum. Après quatre heures, celle-ci commença lentement à baisser, et au bout de huit, dix heures elle redevint à peu près normale : sa chute fut accompagnée par des évacuations muqueuses d'une couleur verdâtre.

L'accablement général et le refus de n'importe quelle substance alimentaire persistait le jour suivant (14 septembre), mais petit à petit le singe commençait à se remettre. Sa vivacité ordinaire reparaissait, et la température rectale redevenait tout à fait normale.

Deux jours après (15 septembre), tout symptôme de malaise ayant disparu, on fit à l'animal, à 9 heures du matin, une deuxième inoculation de 4 c. c. de toxine.

Bien que cette dose fût relativement peu supérieure à la première, la température du rectum descendit immédiatement; le singe commença, au bout d'une heure, à donner des signes d'une grande agitation et d'un fort malaise. Sa tête cachée entre les hanches, les extrémités repliées et entre-croisées, il s'était

blotti dans un coin de la cage en poussant des plaintes, et en proie à un accablement inusité. L'évacuation de selles diarrhéiques verdâtres reparaissait plus abondante que d'habitude. A 2 heures de l'après-midi, l'animal était encore plus triste, affaissé, couché



II. Courbes thermiques de l'intoxication typhique dans le singe.

A. Singe de 910 grammes. Le 13 septembre, à 9 heures du matin, injection sous-cutanée de 3 c. c. de toxine.

B. Même singe. Le 15 septembre, à 9 heures du matin, injection sous-cutanée de 4 c. c. de toxine.

sur la paille; une lacrymation abondante survint, il refusa toute nourriture, et peu à peu il perdit la force de crier et de réagir à la prise de la température rectale, qui continua à baisser sans interruption jusqu'au soir.

Le matin suivant (16 septembre), je retrouvai le singe dans la

même situation, complètement étendu, avec les extrémités relâchées et les yeux entr'ouverts. Même en le molestant, on ne provoquait que d'imperceptibles gémissements; la température rectale était descendue à 35°8'.

Sur toute la surface de la peau du ventre, du thorax et sous les aisselles étaient apparues en très grand nombre des taches d'une couleur rouge hémorragique extraordinairement abondantes, surtout dans la région ombilicale et sur les côtés de la poitrine. Ces taches avaient la forme de roséoles, les unes assez petites et arrondies, les autres assez étendues, irrégulières et tout à fait semblables à des taches hémorragiques sous-cutanées.

Dans l'après-midi, les conditions générales devinrent encore plus difficiles, la température rectale marqua 30°, la respiration se fit lente et difficile (13 respirations à la minute). L'animal, tombé dans un état comateux profond, avait perdu entièrement connaissance, il agitait instinctivement les mains en les portant au ventre; l'expression de la figure indiquait encore la souffrance, mais il se refusait à faire entendre sa voix. Peu à peu la diarrhée apparut tachée de sang, l'état paralytique devint général et tout le corps resta inerte. La respiration se fit toujours plus variable jusqu'à 4 heures du soir, moment où les premiers symptômes de l'asphyxie apparurent, suivis bientôt par la mort. A l'autopsie, faite immédiatement, on trouva les altérations suivantes : cavité abdominale manquant de liquide, rate très grosse et hyperémique, intestins quelque peu congestionnés avec contenu diarrhéique, glandes mésentériques très hypertrophiées et rougies, capsules surrénales fort congestionnées et hémorragiques. On observa, aussi, quelques tubercules miliaires dans les poumons et dans les glandes lymphatiques péritonéales.

La description assez détaillée que je viens de faire des effets de la toxine typhique sur les animaux me permet d'être bref sur le mécanisme biologique de cette intoxication. Il est évident que le poison typhique, introduit ou formé dans l'organisme, outre qu'il agit sur les centres nerveux, comme d'autres poisons, manifeste une influence spéciale et presque élective sur toutes les muqueuses en général, et sur la muqueuse intestinale en particulier.

Cette influence élective du poison typhique, entièrement

indépendante de toute action des microbes, n'a été, jusqu'à présent, signalée que par M. *Silvestrini*[1], dans ses recherches sur l'infection typhique des lapins, après lesquelles l'auteur émet cette idée « qu'on ne doit pas considérer la tuméfaction des plaques de Peyer comme une localisation primitive du virus, mais comme l'expression locale d'un processus général ». Ces lésions sont donc caractéristiques, car elles représentent la note prédominante de l'infection et de l'intoxication typhiques ; outre cela elles ont un grand intérêt, comme étant le point de départ de nos recherches, afin de remonter par analogie à l'interprétation du tableau clinique et anatomique de la fièvre typhoïde humaine. Il est donc très important de les étudier avec soin.

II

LA TOXINE TYPHIQUE ET LES LÉSIONS INTESTINALES DE LA FIÈVRE TYPHOIDE EXPÉRIMENTALE

Ce processus intestinal si grave et si strictement lié à l'intoxication typhique doit, avant tout, être distingué de toutes les autres formes congestives vulgaires qui se manifestent chez les cobayes succombant à l'infection par d'autres microbes plus ou moins toxiques. Il présente, néanmoins, beaucoup de points de contact avec cet ensemble de lésions intestinales qu'a décrites M. *Charrin*[2], chez les lapins empoisonnés avec les toxines du *B. pyocyanique*.

Disons d'abord que le tableau abdominal classique de l'infection typhique n'est pas toujours aussi facile à reproduire que les contractions tétaniques ou les paralysies diphtériques.

J'ai déjà insisté, ailleurs, sur les précautions minutieuses dont il faut s'entourer, lorsqu'on s'applique à étudier une maladie qu'il est si difficile de reproduire chez les animaux, avec tous ses caractères les plus marquants.

Vis-à-vis du poison typhique, les différences individuelles jouent un rôle assez considérable.

Le tableau abdominal de la fièvre typhoïde présente une échelle d'intensité assez variable, et c'est seulement quand on a

1. Studi sull' etiologia dell' ileotifo (*Rivista gen. italiana di Clin. medica*, 1892, n°s 14 et suivant).
2. *La maladie pyocyanique*. Paris, 1889, page 78.

multiplié les expériences qu'on peut se faire une idée exacte de la maladie.

Parfois une seule expérience peut tout démontrer, mais fort souvent elle ne dit que bien peu; et il faut choisir dans le nombre celles qui se prêtent le mieux à l'examen de la question particulière qu'on étudie. C'est ce que j'ai fait pour celle des lésions intestinales, pour lesquelles j'ai choisi les pièces anatomiques les mieux appropriées pour la solution du problème particulier que j'avais en vue.

Immédiatement après la mort de l'animal, les segments d'intestin grêle étaient coupés dans toute leur épaisseur et placés de suite, entiers, dans le liquide fixateur de M. *Mayer* [1] dans lequel ils restaient pendant vingt-quatre heures. Après cela on les lavait dans l'eau distillée, et ensuite on les plongeait pendant deux autres jours, d'abord dans l'alcool à 70°, puis dans l'alcool absolu.

Lorsque la déshydratation de la pièce pouvait être considérée comme parfaite, on la plongeait pendant vingt-quatre heures dans le xylol, pendant douze heures à l'étuve à 55° dans un mélange à parties égales de xylol et de paraffine; enfin, pendant vingt-quatre heures dans la paraffine pure à 55°.

Lorsqu'il s'agissait de coupes complètes et très minces d'intestin, leur coloration demandait l'emploi de la méthode suivante, assez délicate, que j'ai apprise dans le laboratoire de M. Metchnikoff. Les coupes faites par séries sont placées dans un bain d'eau tiède à la surface de laquelle elles s'étalent entièrement; ensuite on les prend avec une bande de papier brouillard passée au-dessous, et on les attache sur le verre couvre-objets préalablement enduit d'eau albumineuse et glycérinée (procédés de M. *A. Borrel* [2]. On traite ensuite la préparation, d'abord par l'alcool absolu qui la déshydrate, et enfin avec le xylol qui en dissout et en enlève complètement la paraffine. Après cela on peut colorer les coupes sur le verre à froid avec

1. La solution fixatrice de M. Mayer a la composition suivante :

Bichlorure de mercure	grammes	7
Acide acétique	c. c.	2
Eau distillée	grammes	100

2. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1893, n° 8, page 601.

les méthodes les plus appropriées. Les colorations que j'ai employées de préférence ont été : le bleu phéniqué de méthylène et de toluidine au tannin (procédé de *M. Nicolle*)[1], la solution triacide de Ehrlich et l'hématéine. Ces méthodes de coloration présentent chacune ses avantages, selon que l'on veut étudier dans les préparations les lésions anatomiques, les modifications cellulaires, ou la façon de se comporter des microbes.

Ce qui frappe avant tout, dans ces préparations, ce sont les graves altérations de la muqueuse. L'épithélium prismatique qui recouvre la surface intestinale est presque complètement détaché. Ce détachement ne s'accomplit pas de cellule à cellule, mais généralement par grands lambeaux, qui se trouvent répandus irrégulièrement dans la cavité de l'intestin, et conservent quelquefois la forme des villosités dont ils se sont détachés en les laissant complètement à nu.

Le noyau des cellules épithéliales est bien conservé, leur *plateau* apparaît normal, le protoplasma ne présente pas ces formations vacuolaires qui indiquent, dans beaucoup de processus aigus intestinaux (choléra), un état de dégénérescence et, avec celui-ci, la mort de l'élément. La seule lésion qu'on retrouve constante, dans ces couches cellulaires qui abandonnent en masse leur siège anatomique, consiste dans une destruction plus ou moins avancée de leur base d'insertion. Celle-ci apparaît presque toujours effilée, enflée, œdémateuse ou corrodée entièrement : il semble presque que la couche épithéliale se soit détachée de la villosité parce qu'a été détruite la partie par laquelle elle devait lui rester adhérente. C'est un processus *sui generis*, évidemment d'origine toxique, et qui présente beaucoup d'analogie avec certaines formes d'entérite desquamative ou ulcéreuse dues à certains empoisonnements (arsenic, sublimé, muscarine, etc.) Les cellules épithéliales de la muqueuse semblent donc très sensibles à l'action du poison typhique.

Après le détachement *in toto* de l'épithélium, les villosités intestinales restent tout à fait nues et représentées par le seul vaisseau lymphatique central revêtu du tissu adénoïde. (Voir fig. 1, pl. VIII.) L'endothélium du lymphatique apparaît intact, et son cul-de-sac est occupé par de grands leucocytes mononu-

1. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1892, page 783.

cléaires avec noyau vésiculaire gros, à réseau chromatique bien distinct et à protoplasma excessivement abondant.

Ces grands éléments contiennent, outre le noyau, des détritus de leucocytes et de globules sanguins. Aux côtés du lymphatique central, il y a des capillaires lymphatiques remplis de leucocytes mononucléaires à protoplasma de moyenne grandeur, avec noyau bien colorable, et quelque peu différents de ceux qu'on trouve dans le cul-de-sac.

Les espaces lymphatiques périglandulaires ont conservé intact leur épithélium et ne contiennent pas de leucocytes.

A la base des villosités on trouve un certain nombre de leucocytes polynucléaires avec des granulations.

Ces éléments caractéristiques, dont on ne connaît encore bien ni les origines ni la signification, mais qu'on trouve assez rarement dans les conditions normales, proviennent probablement du sang, car on en trouve aussi dans les capillaires sanguins, d'où ils se répandent à la base de la villosité sans jamais la dépasser.

Les glandes de Lieberkühn, qui viennent déboucher entre les bases des villosités, présentent aussi des altérations notables. Le corps glandulaire est généralement intact et l'épithélium apparaît aussi intact ; mais, au débouché, là où ce dernier se rattache au restant de l'épithélium intestinal, il commence à présenter les mêmes altérations que celui-ci, et apparaît, en grande partie, détaché ou détruit.

Cette grande résistance de l'épithélium des cryptes de Lieberkühn, en comparaison de sa fragilité au débouché de la glande et en dehors, est peut-être explicable par le fait que les cellules placées dans ces culs-de-sac doivent être considérées, selon M. *Bizzozero*, comme des cellules jeunes (en active karyokinèse), tandis que l'épithélium des villosités, au contraire, serait constitué par des éléments plus adultes (sans karyokinèse) et pour cela moins résistants.

Tous les capillaires veineux de la muqueuse et de la sous-muqueuse sont remplis de sang ; l'endothélium est en bon état, et dans le sang on ne trouve pas de leucocytes. La leucocytose qui se vérifie sur les parois est due aux mononucléaires provenant, peut-être, des follicules renfermés dans les mêmes parois : en effet, la leucocytose due au sang serait constituée de préférence par les polynucléaires.

Les artères mésentériques sont peu remplies de sang, et apparaissent tout à fait normales, tandis que les veines sont énormément dilatées et remplies ; l'état congestif très avancé des tissus n'est donc qu'un phénomène de stase veineuse.

Un intérêt très grand s'attache aussi à l'étude de cette énorme infiltration qui a lieu dans les plaques de Peyer, dont l'hypertrophie caractéristique est considérée, par beaucoup de savants, comme pathognomonique de l'infection typhique.

Dans un processus morbide à cours aussi rapide que celui qu'on obtient chez les animaux, il est clair qu'on ne peut pas obtenir les remarquables tuméfactions des plaques lymphatiques intestinales, qui, dans la fièvre typhoïde humaine, doivent toujours être considérées comme la suite d'un processus de durée beaucoup plus longue.

Toutefois, même dans l'intoxication ou dans l'infection expérimentale, les plaques de Peyer sont toujours plus ou moins grossies et congestionnées : cela démontre qu'elles ressentent d'une façon spéciale l'influence toxique du poison typhique, et dans beaucoup de cas l'augmentation de leur volume est si notable, leur infiltration et leur état congestif sont tellement avancés, qu'il en résulte des analogies tout à fait évidentes avec la première période de l'infiltration et de la dilatation des glandes intestinales dans la fièvre typhoïde humaine.

J'ai eu l'occasion d'observer, sur quelques cobayes morts par infection ou intoxication typhique, des exemples vraiment splendides de cette hypertrophie des glandes de Peyer, et j'en ai fait l'examen microscopique avec les mêmes méthodes que pour l'examen de l'intestin. Dans la figure 2, planche VIII, est dessinée, à un faible grossissement, la coupe transversale dans toute son épaisseur d'un intestin grêle de cobaye mort à la suite d'une injection sous-cutanée de toxine typhique. La coupe passe justement par le centre d'une plaque de Peyer énormément hypertrophiée, dans laquelle on voit une accumulation immense de cellules lymphatiques dans l'intérieur des follicules, et aussi une vaste infiltration cellulaire périfolliculaire qui a envahi toute la sous-muqueuse. Il n'y a presque plus trace de la structure anatomique typique de la plaque lymphatique simplement hypertrophique, et l'infiltration apparaît tellement étendue que l'on dirait une véritable infiltration purulente.

Si l'animal avait survécu un certain nombre d'heures à une lésion si étendue, celle-ci serait sûrement devenue le siège d'un processus suppuratif, et il se serait formé un de ces abcès folliculaires caractéristiques qui, après leur rupture, constituent ces ulcères cratériformes, spéciaux à la fièvre typhoïde humaine.

Il est assez rare de retrouver, dans ces infiltrations des plaques de Peyer, les bacilles typhiques, quand les cobayes ont succombé à l'injection du virus. Les bacilles, même s'ils sont injectés sous la peau, se multiplient en grand nombre dans le péritoine, où ils provoquent une vaste desquamation des cellules endothéliales, mais ils ne dépassent presque jamais le tissu connectif sous-endothélial, et, en conséquence, on ne les trouve que par exception dans la membrane musculaire.

Au contraire, ils s'accumulent en quantité énorme dans les ganglions lymphatiques, dans les espaces lymphatiques et dans les mailles du tissu connectif du mésentère, où on les voit groupés en petits foyers comme dans la rate de l'homme, et beaucoup sont logés à l'intérieur des cellules lymphatiques. On ne les retrouve jamais dans les vaisseaux sanguins.

Ils présentent un aspect toujours uniforme : ils sont courts, gros[1], réguliers, entassés, et on peut facilement les différencier du *B. coli* qui se signale par ses dimensions plus grandes et plus irrégulières, et surtout par sa plus grande longueur. On trouve habituellement le *B. coli* sur toutes les parois de l'intestin, surtout à l'intérieur des glandes, et dans la sous-muqueuse.

Du côté du péritoine, il échappe à l'observation, mais on le met en évidence avec les cultures.

1. Le bacille typhique employé dans mes récentes recherches présentait en effet ces caractères, qui s'accordent avec ceux signalés par d'autres observateurs. Cependant, je dois faire remarquer qu'en d'autres occasions j'ai trouvé des bacilles typhiques, d'une authenticité bien établie, lesquels, même après avoir atteint le plus haut degré de virulence, se développaient, dans les cobayes, sous forme de petits bâtons, beaucoup plus allongés et plus minces que ceux dont je viens de faire la description. Les formes plus courtes et plus grosses ont, d'ordinaire, la tendance à se réunir dans les tissus par petits foyers, en prenant cette apparence bien connue des localisations spléniques dans la fièvre typhoïde humaine. Les formes plus allongées et plus minces sont au contraire distribuées irrégulièrement, comme dans l'infection à type septico-hémique. Par là et par d'autres caractères morphologiques et culturaux apparaît évidente l'existence de nombreuses variétés du bacille d'Eberth. Cette idée est d'autant plus admissible maintenant, que l'existence de multiples variétés dans les espèces microbiques a été déjà démontrée par M. *Foà* pour les pneumocoques, par M. *Pasquale* pour les streptocoques, par M. *Péré* pour le *B. coli*, et par beaucoup d'autres observateurs pour les vibrions cholériques.

Cette émigration du *B. coli* de l'intestin, qui s'observe souvent dans l'infection typhique, est encore plus fréquente dans l'intoxication typhique. Lorsque les animaux meurent par suite de l'inoculation des toxines, on le retrouve en grande quantité dans l'exsudat péritonéal, surtout si la mort est arrivée après vingt-quatre heures.

Nous reviendrons, dans le chapitre suivant, sur les causes immédiates de ces infections secondaires par le *B. coli;* mais, en attendant, nous pouvons conclure des observations faites jusqu'à présent que : *La fièvre typhoïde expérimentale est de préférence une infection du système lymphatique, et que c'est seulement à la toxine produite par le développement des bacilles d'Eberth que sont dues, en très grande partie, toutes ces lésions anatomiques intestinales qui étaient considérées jusqu'à présent comme autant de localisations du virus.*

III

LES LÉSIONS TOXIQUES ET LE ROLE DES MICROBES INTESTINAUX DANS LA FIÈVRE TYPHOIDE EXPÉRIMENTALE

L'action très énergique et presque élective, exercée par le poison typhique sur la muqueuse intestinale, nous explique, en grande partie, les phénomènes locaux qu'on observe dans le tractus digestif, pendant la fièvre typhoïde humaine et expérimentale.

Il est désormais établi que cette entérite desquamative aiguë, que tous les auteurs ont décrite dans la première, et que j'ai signalée dans la seconde, est due en grande partie à la toxine typhique qui, en se formant dans l'organisme, agirait sur l'intestin en déterminant les classiques lésions de la fièvre typhoïde.

Toutefois, cette nouvelle connaissance ne suffit pas pour éclaircir entièrement cet ensemble de phénomènes si complexes et si graves qui se développent dans l'intestin pendant la période de l'entérite typhique. A l'autopsie des animaux morts soit par infection, soit par intoxication typhique, nous trouvons toujours un contenu entérique liquide, diarrhéique, et le plus souvent très hémorragique.

Si nous examinons ce liquide, non seulement nous y observons en quantité extraordinaire tous les produits de la desquamation, mais nous y trouvons, aussi, une quantité innombrable

de microbes, dépassant tout ce qu'il est possible de constater dans le contenu entérique d'un animal sain.

Cela signifie que, pendant l'infection et l'intoxication typhique, les microbes augmentent de nombre dans l'intestin. Il est donc intéressant de connaître leur provenance, leur façon d'agir et leur fonction éventuelle dans le processus intestinal.

Quelques recherches préliminaires m'avaient déjà démontré que la flore microbique intestinale est constituée par une unique espèce, morphologiquement non différenciable par les cultures, du *bacterium coli* ou du bacille d'Eberth.

Pour identifier rapidement les deux espèces, j'ai eu recours aux cultures sur plaque de gélatine à 2 0/0 de lactose, bleuie avec de la teinture aqueuse de tournesol. Cette méthode, déjà proposée par M. *Laruelle*[1], pour reconnaître le *B. coli*, et conseillée ensuite aussi par M. *Wurtz*[2] pour la diagnose différentielle du bacille typhique, m'a rendu des services excellents pendant toutes mes recherches. Chaque fois que je faisais l'autopsie d'un cobaye mort par infection ou par intoxication typhique, j'isolais une anse de l'intestin grêle, je la stérilisais à l'extérieur avec un fer rouge; j'en perforais ensuite la paroi et, avec une grosse anse de platine, j'en retirais toujours la même quantité de liquide diarrhéique que je délayais exactement dans un tube contenant 5 centimètres cubes de bouillon stérilisé.

Je prélevais un peu de ce bouillon avec une pipette Pasteur, et j'en faisais des cultures sur plaques, en laissant tomber une, deux, trois gouttes dans chaque tube de gélatine au tournesol. La pratique prolongée de cette technique manuelle finit par rendre très exact le rapport numérique entre le contenu des microbes intestinaux et la quantité des colonies qui se sont développées dans les cultures sur plaques.

Ces cultures étaient laissées à la température de la chambre, et après trente-six ou quarante-huit heures, elles présentaient déjà un développement assez avancé des colonies.

Il est notoire que, sur cette gélatine lactosée, les colonies du *B. coli* se développent en rougissant fortement le milieu nutritif

1. Études bactériologiques sur les péritonites par perforation (*La Cellule*, vol. V, 1889).

2. Sur deux caractères différentiels entre le B. d'Eberth et le *B. coli comm.* (*Société de Biologie*, 12 déc. 1891).

autour d'elles, tandis que les colonies du bacille typhique ne modifient en rien la coloration. En conséquence, un simple examen de ces cultures permet d'évaluer non seulement la quantité de microbes contenus dans le liquide intestinal, mais aussi leur proportion dans le mélange.

J'ai dit, plus haut, que cette méthode m'a rendu des services importants, mais c'est toujours à la condition que ces cultures soient faites en grand nombre.

Le rougissement de la gélatine, quand s'y développe l'espèce coliforme, est habituellement assez rapide, et, si les colonies sont très nombreuses, déjà après vingt-quatre heures toute la plaque a perdu sa couleur; mais quelquefois le rougissement se produit seulement après quelques jours, ou partiellement, ou même pas du tout. Cela dépend, peut-être, d'une plus ou moins grande énergie fermentative des microbes, laquelle, comme je l'ai très souvent vérifié et, comme je veux le dire tout de suite, n'a aucun rapport constant avec leur degré de virulence.

On peut, en effet, trouver des variétés de *B. coli* douées d'un faible pouvoir fermentatif et d'une grande virulence, et réciproquement. Les récentes et remarquables recherches de M. *Péré*[1] sur cette question ont déjà démontré l'existence de variétés de *B. coli* morphologiquement identiques, mais tout à fait distinctes par leurs propriétés bio-chimiques.

Donc, lorsque nous nous trouvons en présence de colonies qui rougissent la gélatine, nous pourrons conclure sûrement au *B. coli*, mais si l'apparence de la gélatine ne se modifie pas, on ne pourra pas, non plus, conclure à la diagnose du bacille typhique. Dans ces cas, qui du reste sont une exception très rare, il est nécessaire d'avoir recours à l'ensemencement des colonies dans les bouillons lactosés de M. *Perdrix*, qui sont aujourd'hui les réactifs les plus sensibles et les plus rapides pour différencier les deux microbes.

Les résultats de ces recherches, que j'ai pratiquées systématiquement pendant tout le cours de mes expériences sur le contenu intestinal d'un grand nombre de cobayes morts d'infection ou d'intoxication, peuvent se résumer ainsi.

1. Contribution à la biologie du *B. coli* et du B. typhique (*Annales de l'Ins. Pasteur*, 1892, p. 512).

L'intestin grêle des cobayes normaux a un contenu très modéré de microbes, et ceux-ci sont généralement représentés par l'espèce coliforme[1] : je n'ai que bien rarement trouvé d'autres espèces; souvent les plaques restaient tout à fait stériles à cause de la trop forte dilution, pour le petit nombre de microbes ensemencés. En même temps que les cultures sur plaques dans la gélatine lactosée, je faisais toujours des ensemencements en trait sur gélose avec la matière intestinale; ces cultures, aussi, étaient presque toujours des cultures pures de *B. coli* dans les cobayes normaux, et me donnaient déjà, après douze heures, une idée du contenu en germes de l'intestin.

On obtient des résultats tout à fait différents lorsque l'on cultive le contenu du gros intestin. Ici, la multiplicité des espèces microbiennes est plus notable[1]; sur toutes prédomine le *B. coli*, mais on obtient toujours des colonies de coccus ou d'autres bactéries facilement différenciables de ceux d'Escherich.

Généralement, le *B. coli* de l'intestin normal a un faible pouvoir fermentatif, et il est rare que les plaques de gélatine lactosée tournent complètement au rouge : le virage est lent, et après quelques jours reste stationnaire. En conséquence, si le nombre des colonies n'est pas très grand, la culture plate présente seulement des taches rouges sur fond bleu. Mais les résultats changent complètement lorsque, au lieu de cultiver le contenu intestinal des cobayes normaux, on cultive le contenu intestinal des cobayes morts par infection ou par intoxication typhique. Dans ce cas, la quantité des colonies est tellement énorme qu'elles échappent à tout calcul, et cette différence numérique est si constante qu'on pourrait en évaluer approximativement la proportion à 1 pour 1,000. Il suffit d'avoir fait quelquefois ces recherches comparatives pour avoir une idée exacte de cette règle qui ne souffre jamais d'exception.

Donc, *dans le contenu diarrhéique de cobayes morts par infection ou intoxication typhique aiguë, la quantité des microbes intestinaux augmente en proportion considérable.*

Il faut noter que ces recherches ont été faites presque

1. Selon M. *de Giaxa*, l'intestin grêle des cobayes contient environ de 1,300 à 1,500 microbes, et le gros intestin de 2,000 à 5,000 microbes pour chaque décigramme de matière. Voir : Del quantitativo di batteri nel contenuto del tubo gastro-enterico, etc. (*Giornale Internaz. delle Scienze Mediche*, vol. X, 1888.)



toujours aussitôt après la mort des animaux et, par suite, on doit exclure d'une façon absolue la possibilité d'une multiplication *post mortem*.

Mais les changements de la flore intestinale ne se bornent pas à la seule augmentation numérique. Les microbes qui se développent dans la gélatine se trouvent toujours, dans ces cas, à l'état de culture pure, et sont représentés exclusivement par l'espèce coliforme.

Je ne me rappelle pas avoir jamais trouvé, dans les cultures en plaques faites avec le contenu intestinal diarrhéique, une seule colonie qui n'appartînt pas au *B. coli*. Les bacilles d'Escherich dominent d'une façon absolue, ce qui fait croire que les bacilles typhiques ne pénètrent pas en quantités appréciables dans le canal digestif, même inoculés dans le péritoine, tandis que le *B. coli*, dans ces circonstances, tend à se multiplier et à *rester seul dans l'intestin*.

Cette dernière circonstance est d'autant plus remarquable que les préparations microscopiques du contenu intestinal normal démontrent, au contraire, la présence d'autres espèces microbiennes, dont quelques-unes sont même susceptibles de prendre la coloration de Gram; et que, de plus, les cultures en gélatine du contenu intestinal des cobayes normaux, tout en montrant la prédominance absolue de l'espèce coliforme, sont bien loin de la présenter d'une façon si exclusive.

Il se reproduit ici le phénomène déjà observé par M. *E. Frænkel*[1] et M. *Barbacci*[2] dans les exsudats des péritonites par perforation, et par *Schmidt*[3] dans les selles des nourrissons, c'est-à-dire que l'examen microscopique révèle la présence de nombreuses formes microbienes, tandis que les cultures ne démontrent que le seul développement du *B. coli*.

M. *E. Frænkel*, qui n'employait pas la méthode de Gram, attribuait une origine unique aux différentes formes qu'il trouvait dans les préparations microscopiques, et les considérait comme différents types de développement du *B. coli*. M. *Schmidt*, qui se servait, au contraire, de la méthode de Gram, arriva à la

1. Zur Ætiologie der Peritonitis (*Münchener Med. Wochens*, 1890, nº 2).
2. Sulla étiologia e patogenesi della peritonite da perforazione (*Lo Sperimentale*, 1893, Fas IV).
3. Zur Kenntniss der Bacterien der Sänglingsfäces (*Wiener klin. Woch.*, 1892, nº 45).

conclusion qu'en présence des matières grasses dans les selles des nourrissons, le *B. coli* pouvait résister à la décoloration par cette méthode de *Gram*. M. *Barbacci* n'accepte pas cette identification si peu d'accord avec les résultats de nos connaissances actuelles, et tandis qu'il insiste, d'un côté, sur la présence de différentes espèces microbiennes bien distinctes dans les péritonites par perforation, il reconnaît, d'un autre côté, qu'avec les cultures on obtient seulement des colonies du *B. coli*. Malgré les très nombreuses recherches faites *in vitro* et sur l'animal vivant afin d'obtenir l'explication d'un phénomène si intéressant, M. *Barbacci* ne se prononça pas d'une manière définitive.

Dans mon cas, la question était, sans doute, beaucoup moins complexe : si l'on peut toujours obtenir de l'intestin des cobayes normaux différentes espèces microbiennes, tandis que, de l'intestin des cobayes morts d'intoxication typhique, on ne réussit à isoler que la seule et unique espèce coliforme, bien que, même dans ce cas, l'examen microscopique révèle la présence d'autres espèces différentes, cela indique très probablement que ces dernières doivent être considérées comme mortes.

Il n'est pas facile d'expliquer en quelle façon la multiplication excessive du *B. coli* peut nuire au développement des autres microbes intestinaux, jusqu'à les anéantir complètement.

Quelques expériences faites *in vitro* ne m'ont donné aucun éclaircissement sur ce sujet, puisque j'ai trouvé que, même dans le liquide de vieilles cultures filtrées du *B. coli*, quelques microbes, isolés de l'intestin, peuvent se développer assez bien. Mais on peut supposer que les matières toxiques formées par le *B. coli* dans l'intestin sont différentes de celles qui se forment dans les cultures. Le siège si spécifiquement électif du *B. coli* dans l'intestin de tous les mammifères dépose en effet dans ce sens, que cette espèce microbique y trouve des conditions exceptionnellement favorables à sa vie et au développement complet de toutes ses propriétés biologiques.

Enfin, quelle que soit la façon dont s'effectue une sélection si rapide et complète parmi les différents microbes intestinaux, il reste toutefois la constatation de cette intéressante loi biologique, c'est-à-dire que, dans les infections ou dans les intoxications typhiques, l'intestin grêle, qui représente la localisation par excellence des principales lésions anatomiques de la mala-

die, est le siège d'une multiplication si grande du *B. coli*, que cette dernière espèce finit par y dominer à elle seule au détriment de toutes les autres. Cette circonstance est non seulement en accord avec ce qu'on vérifie dans la fièvre typhoïde humaine, pendant laquelle on ne réussit, d'ordinaire, à retrouver dans les selles que le seul *B. coli*[1], mais elle présente en outre, sous un aspect différent, beaucoup d'analogies avec les récentes observations de MM. *Gabritchewsky* et *Maljutin*[2] sur les selles des cholériques, puisqu'il a été observé que, dans l'entérite cholérique aussi, le développement excessif des vibrions dans l'intestin exerce une action bactéricide si puissante sur les autres microbes intestinaux, surtout pour le *B. coli*, que les vibrions et leurs toxines finissent par rester dominateurs absolus du canal digestif.

Une autre question strictement connexe à la multiplication exagérée du *bacterium coli* dans l'intestin, regarde son pouvoir pathogène. De nombreuses observations, déjà très souvent confirmées dans la pathologie humaine, ont prouvé que chaque fois qu'il existe une lésion intestinale (diarrhée, entérite, etc.), le *B. coli* se présente avec une virulence supérieure à celle qu'il possède ordinairement.

On comprend *a priori* l'importance de ce fait, surtout dans la pathologie de la fièvre typhoïde, en présence des lésions du canal intestinal. Il fallait donc le préciser exactement.

Bien que le *B. coli* ait été considéré, pendant longtemps, comme un simple *saprophyte* de l'intestin, néanmoins on lui a reconnu récemment un certain degré de pouvoir pathogène.

J'ai isolé plusieurs fois le *B. coli* de l'intestin des cobayes normaux : son injection dans le péritoine est parfois mortelle; son inoculation sous-cutanée, si elle est abondante, détermine des foyers suppuratifs qui, avec le temps, tuent les animaux, par cachexie. Cependant, dans ce cas, il y a une question de dose, et j'ai trouvé, en effet, que l'inoculation sous-cutanée d'une culture entière de vingt-quatre heures sur gélose n'est pas habituellement mortelle : tout au plus elle provoque quelques petites

1. Voir : RODET et G. ROUX. — Bacille d'Eberth et bacillus coli. (*Arch. de méd. expérim.*, 1892, nº 3, pag. 317.)

2. Ueber die bacterienfeindlichen Eigenschaften des Cholerabacillus. (*Centralblatt für Bakt. u. Par.* 1893, nº 24, p. 780.)



zones d'infiltration qui guérissent toujours avec le temps.

Après avoir reconnu cette dose minima qui ne tuait jamais les animaux, j'ai fait une longue série de recherches comparatives pour voir la façon d'agir du *B. coli* retiré des intestins des cobayes morts par infection ou intoxication typhique.

Pour cela, en outre des cultures sur plaque de gélatine que je faisais à chaque autopsie, pour observer les variations numériques des microbes intestinaux, je pratiquais régulièrement des cultures en trait sur gélose, et, le jour suivant, après les avoir délayées dans quelques centimètres cubes de bouillon, je les inoculais sous la peau d'autant de cobayes.

Les résultats de toutes ces recherches, sauf quelques exceptions, ont été parfaitement d'accord : le *B. coli obtenu de l'intestin des animaux morts par entérite typhique était toujours très virulent*, et tuait les cobayes inoculés après douze, vingt-quatre heures, en déterminant régulièrement le tableau de l'infection générale à forme septicohémique.

Une démonstration encore plus claire de l'augmentation de virulence du *B. coli* dans l'intoxication typhique, m'a été fournie par le singe dont j'ai déjà parlé à propos de la toxine typhique.

Deux jours avant l'inoculation sous-cutanée de la toxine, j'ai fait sur ce singe, avec une grosse canule de Malassez, un entéroclysme de 20 centimètres cubes d'eau stérilisée. Après l'avoir retenue mécaniquement, pendant quelques moments, dans l'intestin, je reçus cette eau dans un récipient stérilisé, et j'en isolai le *B. coli* dont elle s'était abondamment souillée.

A la dose d'une culture entière de vingt-quatre heures sur gélose, ce *B. coli* était tout à fait inoffensif sous la peau des cobayes.

Après la mort de l'animal, j'isolai de nouveau le *B. coli* du contenu rectal du cadavre, et cette fois je le trouvai doué, comme d'habitude, d'une grande virulence : il tuait les cobayes en douze heures, par inoculation sous-cutanée.

Désormais aucun doute ne pouvait plus subsister : *Dans l'intestin des animaux morts par infection ou intoxication typhique, le B. coli non seulement se multiplie d'une façon extraordinaire, mais il gagne une virulence que d'habitude il n'a pas.*

Ce nouveau facteur, qui vient régulièrement compliquer d'une façon imprévue le tableau de la fièvre typhoïde expérimentale, et peut-être même celui de la fièvre typhoïde humaine, mérite

donc d'être étudié dans ses causes et dans ses conséquences. Dans le cours de l'entérite typhique typique, nous devons en effet considérer : 1° l'action spécifique du poison sur la muqueuse intestinale ; 2° les altérations anatomiques consécutives de cette muqueuse ; 3° la multiplication et la virulence du *B. coli*.

Que les graves altérations de la muqueuse intestinale soient dues exclusivement au poison typhique, c'est ce qu'ont démontré les examens anatomiques comparatifs des diverses muqueuses des cobayes morts par intoxication, et d'autres expériences, qui se rattachent à la nature et au mécanisme d'action de la toxine, le démontreront à leur temps. Il restait donc à décider si le *B. coli* augmente de virulence parce qu'il se trouve soudainement dans l'intérieur d'un organe déjà altéré, ou bien parce que la toxine typhique éliminée par la muqueuse intestinale exalte son pouvoir pathogène; cette dernière hypothèse était rendue plus probable par une récente observation très intéressante de M. *Roncali*[1], qui a trouvé que quelques microbes atténués, parmi lesquels le bacille d'*Eberth*, peuvent regagner leur virulence primitive lorsqu'ils sont restés quelque temps à végéter dans la toxine tétanique, même après avoir subi plusieurs passages successifs, faits pour les dépouiller complètement des dernières traces de tétanotoxine.

Quelques recherches faites par moi, en cultivant de différentes façons le *B. coli* atténué dans de vieilles cultures typhiques, filtrées ou stérilisées à 58°, avec ou sans addition de peptone, etc., ne m'ont jamais amené à aucun résultat. Le *B. coli*, cultivé de cette façon, s'est toujours montré inefficace, même dans des inoculations successives sur les animaux. Mais, comme il faut toujours se méfier des résultats qu'on obtient en dehors de l'organisme, j'ai pensé qu'il valait mieux expérimenter sur l'animal vivant.

Parmi les nombreuses muqueuses sur lesquelles s'exerce d'une façon presque élective l'action du poison typhique, j'ai mentionné plus haut la muqueuse de l'utérus.

Lorsqu'un cobaye succombe à l'infection ou à l'inoxication typhique, on trouve d'ordinaire les cornes et le corps de l'utérus

1. Dell' azione del veleno del bacillus tetani, etc. (*Annali dell' Istit. d'Igiene della R. Università di Roma*, 1893, page 138.)



si excessivement tuméfiés, congestionnés et œdémateux, qu'on comprend facilement que la muqueuse de l'utérus doit ressentir la même influence toxique qui s'exerce sur la muqueuse intestinale. Cependant, la muqueuse de l'utérus, malgré les signes évidents d'un processus congestif, ne présente aucune de ces altérations si graves et répandues, qui se retrouvent dans la muqueuse de l'intestin.

La cavité de l'utérus présentait donc les plus grands avantages pour l'étude exclusive de l'influence éventuelle du poison typhique, qui aurait pu s'exercer sur le *B. coli*, à travers les parois de l'organe, très altérées.

Dans la fièvre typhoïde expérimentale, l'élimination des bacilles d'*Eberth* par la surface de l'utérus ne se produit presque jamais, ou se produit en quantité tout à fait négligeable. De plus, la cavité utérine des cobayes, même adultes, est ordinairement stérile en microbes. Mais, pour plus de garantie, j'ai toujours employé dans ces expériences de petites femelles encore intactes. Après avoir préparé la culture en bouillon d'un *B. coli* déjà devenu notoirement inactif, je perforais l'hymen de deux jeunes cobayes avec une canule stérilisée, et j'injectais dans la cavité utérine 2 c. c. de la culture. Tout de suite après, dans un des deux animaux, j'inoculais sous la peau une dose mortelle de toxine ou de virus typhique, et je laissais l'autre comme témoin. Après huit, dix, vingt-quatre heures, le cobaye, qui avait reçu l'inoculation de la toxine ou du virus, succombait invariablement d'intoxication ou d'infection en présentant le tableau typique abdominal déjà décrit, et l'habituel processus congestif très grave de l'utérus. Alors je tuais aussi le cobaye témoin, et, des deux utérus, je reprenais le *B. coli* dont je faisais directement deux cultures en trait sur gélose que, le jour suivant, j'inoculais sous la peau d'autant de cobayes.

Les résultats de ces dernières inoculations étaient toujours tels qu'il ne peut subsister aucun doute sur la question que je m'étais proposée. Les cobayes qui recevaient le *B. coli* retiré de l'utérus des animaux témoins restaient en vie ; les autres, qui étaient inoculés avec le *B. coli* retiré de l'utérus des cobayes morts par intoxication ou infection typhique, mouraient le plus souvent en dix, douze heures, à la suite d'une infection généralisée du *B. coli*.

Il est donc établi que, *dans la fièvre typhoïde expérimentale, le B. coli exalte sa propre virulence, plus par effet de la toxine qui agit ou s'élimine par la surface des muqueuses très congestionnées, que par suite de la gravité exceptionnelle des lésions toxiques de ces muqueuses.* Comme d'un côté le poison typhique donne la virulence et avec elle le pouvoir pathogène à une quantité innombrable de microbes d'habitude inoffensifs, et comme de l'autre il détruit l'épithélium de la muqueuse intestinale qui, tout le long du canal digestif, forme l'unique barrière de défense contre eux, il est naturel de se demander quelles peuvent être, pour l'organisme malade, les conséquences de ces deux facteurs qui surgissent en même temps pour compliquer un processus morbide déjà par lui-même si grave et complexe.

La réponse à cette dernière partie de la question n'est pas difficile. Tous ceux qui ont eu occasion de faire des expériences sur l'infection typhique expérimentale ou des recherches sur les cadavres des typhiques, ont toujours rencontré le *B. coli* qui, après avoir traversé les parois intestinales devenues peu résistantes à leur passage, s'était localisé et développé en différentes parties de l'organisme. Ces infections secondaires du *B. coli*, dont je me suis déjà occupé dans mon précédent mémoire, sont si connues, même dans la pathologie humaine, que je crois tout à fait inutile d'y insister plus longtemps pour en démontrer leurs rapports directs avec les lésions toxiques intestinales.

Je dois, cependant, répéter ici que l'émigration du *B. coli* de l'intestin se manifeste non seulement chez les animaux qui meurent d'infection, mais encore chez ceux qu'on a tués par l'injection des toxines. Ainsi, dans un cas comme dans l'autre, je retrouvais le *B. coli* dans le péritoine, dans la rate, et quelquefois aussi dans le sang. Rien de moins surprenant, du moment que le *B. coli* émigre en conséquence de la disparition de l'épithélium intestinal, et que celle-ci se produit aussi bien dans l'infection que dans l'intoxication typhique.

Les infections secondaires par le *B. coli* représentent donc la dernière phase d'un processus grave, sur l'évolution duquel nos recherches ont établi seulement des points de départ.

Pour cela, il est désirable que d'autres investigations en élargissent et en complètent la connaissance. Nous verrons, plus tard, quelles analogies peuvent être établies entre ces notions

au sujet de la fièvre typhoïde expérimentale et | l'évolution de la fièvre typhoïde humaine.

IV

LA VACCINATION CONTRE LA FIÈVRE TYPHOIDE EXPÉRIMENTALE ET SES EFFETS SUR LES MICROBES INTESTINAUX

La grande affinité morphologique du bacille d'*Eberth* avec l'espèce coliforme a été l'objet, en ces derniers temps, d'un grand mouvement scientifique, destiné à en fixer la signification par rapport à l'étiologie de la fièvre typhoïde.

Dans une autre occasion, j'apporterai aussi une contribution d'observations personnelles sur cette question.

Pour le moment, comme l'activité simultanée de ces deux microbes, dans la fièvre typhoïde expérimentale, soulève la question de leur éventuelle et réciproque action infective, toxique et immunisante, nous nous arrêterons à cette dernière propriété en renvoyant le reste à plus tard.

Les premiers résultats de la vaccination réciproque des cobayes contre le bacille typhique et le *B. coli* remontent à mes premières recherches sur la fièvre typhoïde.

Dans le mois de septembre 1892, à l'Institut Pasteur, je montrais les premiers cobayes vaccinés contre le *B. coli* et ayant résisté à l'inoculation dans le péritoine du B. typhique, et les premiers cobayes vaccinés contre ce dernier, ayant résisté à l'inoculation intrapéritonéale du *B. coli*. La méthode de vaccination avait été dans les deux cas tout à fait identique à celle que j'ai déjà décrite contre la fièvre typhoïde expérimentale.

J'indique cette date, non à titre de priorité scientifique, mais seulement comme souvenir personnel et sans insister sur la valeur téléologique du résultat, puisque, peu de mois plus tard, MM. *Cesaris Demel* et *Orlandi* [1], sans connaître mes recherches, faisaient la même constatation dans le laboratoire de M. Foà, à Turin.

Le fait que la vaccination contre le bacille d'*Eberth* préserve aussi contre les bacilles d'*Escherich* nous fait rechercher ce que

1. Contributo allo studio della equivalenza biologica dei prodotti del B. coli et del B. typhi (*Gazetta Medica di Torino*, nº 11, 1893).

deviennent les bactéries coliformes de l'intestin, dans les cobayes vaccinés contre la fièvre typhoïde. L'idée de l'immunité contre une espèce déterminée de microbes implique nécessairement la destruction de cette dernière dans l'organisme vacciné, et, comme dans l'intestin des cobayes normaux le *B. coli* se trouve toujours en quantité plus ou moins grande, on se demande comment il se comporte lorsque les cobayes sont soumis à la vaccination.

On comprend *a priori* que cette question doit être plurilatérale. Les bactéries coliformes, qui se trouvent dans l'intestin d'un animal qui devient vacciné, entrent en relations multiples avec les sucs digestifs, avec les cellules et les autres microbes du canal intestinal, et il faudrait faire l'étude systématique de toutes ces influences.

Cela pourra être fait plus tard, mais, en attendant, nous relevons à l'autopsie d'un cobaye ou d'un lapin bien vaccinés contre le virus typhique, une circonstance de grand intérêt, c'est l'excessive diminution ou la disparition de tous les microbes du contenu de l'intestin grêle.

Ce résultat est constant pour tous les cobayes et les lapins vaccinés, mais il est aussi susceptible de nombreuses variations, selon que la vaccination a été pratiquée plus ou moins bien et selon la sensibilité des différents animaux.

La vaccination contre la fièvre typhoïde expérimentale consiste dans l'inoculation sous la peau des animaux, et pendant plusieurs jours consécutifs, d'une certaine dose de produits toxiques du bacille d'*Eberth*.

Dans les cultures ordinaires stérilisées, telles qu'on les emploie pour ces vaccinations, la dose des matières toxiques est toujours assez faible, de façon que les cobayes et les lapins puissent en recevoir, dans l'espace de peu de jours, une quantité relativement assez abondante, sans autre conséquence qu'un amaigrissement plus ou moins prononcé.

Cet amaigrissement, dans quelques cas, peut être excessif, dans d'autres à peine évident, et cela démontre que la tolérance du poison, *cæteris paribus*, est variable même pour des animaux de la même espèce.

Dans le premier cas, en effet, on peut aussi observer à longue échéance la mort par cachexie, dans le second on obtient tout de suite une solide vaccination.

Cependant l'injection du poison typhique, même à doses très subdivisées, dans les animaux excessivement sensibles, se fait bientôt ressentir sur l'intestin, qui devient hypérémique et congestionné. Peu à peu la muqueuse intestinale commence à subir les premiers phénomènes de l'influence presque élective de la toxine typhique. Cela n'est pas tout à fait indifférent pour le *B. coli* intestinal, qui commence alors à se multiplier, devient virulent, traverse les parois intestinales et émigre dans l'organisme.

Cette auto-infection par le *B. coli*, dans les animaux qu'on vaccine, ne conduit pas ordinairement à la mort, peut-être en raison de leur immunité déjà acquise en partie, mais détermine de graves localisations suppuratives, surtout dans les cavités séreuses.

Cependant ces exsudations purulentes peuvent aussi guérir complètement et, dans ce cas, même après longtemps, on retrouve dans les cavités séreuses des résidus d'anciens exsudats en partie déjà organisés, adhérents à la surface de quelques viscères et complètement amicrobiques. D'autres fois, l'animal peut périr en peu de jours avec tous les symptômes et les caractères anatomiques des véritables pleurésies, péricardites, ou péritonites chroniques par *B. coli*.

C'est de cette façon que doivent être expliqués quelques insuccès obtenus pendant ou après les vaccinations sur beaucoup d'animaux, c'est-à-dire lorsque, sans cause appréciable, quelques-uns d'eux tombent malades et meurent en présentant des pleurésies, des péricardites ou des péritonites purulentes.

Le *B. coli* retiré des exsudats de cette nature, où on le trouve à l'état de pureté, est habituellement très actif, ce qui signifie que l'animal est, en ces cas, vacciné contre l'infection générale, et succombe seulement à la gravité du processus local.

Au contraire, lorsque la vaccination procède régulièrement, de façon que du côté de l'intestin il y ait tolérance parfaite au poison, sans qu'il se produise pour cela aucun processus réactif, le *B. coli* ne se multiplie et ne s'exalte pas, mais au contraire il tend à disparaître peu à peu, très probablement à cause des cellules de la muqueuse intestinale qui peuvent compter, on le sait, parmi les éléments phagocytaires fixes des plus actifs.

Que cette destruction soit causée plutôt par les cellules que

par d'autres influences éventuelles, c'est ce que prouve ce fait, qu'on l'observe seulement dans les parties du canal digestif dont les parois sont très rapprochées entre elles, et dans lesquelles l'arrêt momentané des matières permet le contact immédiat entre les cellules et les microbes.

En quelques cas, cette auto-stérilisation du canal digestif, surtout le long de l'intestin grêle, est partielle, mais le plus souvent est tout à fait complète; dans ce cas même, en enlevant avec la spatule de platine de larges traits de muqueuse entérique qu'on ensemence directement, aucun microorganisme ne se développe : tous les microbes ont complètement disparu.

Là où la grosseur du canal intestinal, comme par exemple dans le gros intestin, permet le séjour de beaucoup de matières, la quantité de microbes intestinaux, représentés surtout par le *B. coli*, est, au contraire, très grande.

En ce cas, il est clair que l'épaisseur même du contenu intestinal, (outre le fait déjà révélé par M. *de Giaxa*[1] sur le contenu plus grand de germes dans le gros intestin en comparaison de l'intestin grêle) dérobe mécaniquement le corps des microbes au contact des cellules.

Cependant, entre ces deux extrêmes de la vaccination, on comprend facilement qu'il puisse y avoir des conditions intermédiaires par suite desquelles l'intestin peut réagir plus ou moins légèrement, pendant ou peu après la vaccination, en manifestant des phénomènes hypérémiques ou congestifs. Ces phénomènes ne présentent aucune gravité, ne sont suivis par aucune complication, mais ils rendent impossible la destruction des microbes intestinaux; à cause des conditions anormales du canal digestif, ces derniers se trouvent au contraire augmentés de nombre.

Mais ce sont là des questions sur lesquelles une vraie série d'observations systématiques pourra seule nous éclairer.

V

RÉSUMÉ

Les recherches qui ont été l'objet de ce second mémoire ont eu, comme principal but, de mettre mieux en évidence les rap-

1. Loc. cit.

ports entre le virus typhique et les altérations caractéristiques de la fièvre typhoïde humaine et expérimentale.

Les principaux résultats qui ont été obtenus peuvent se résumer dans les conclusions suivantes :

1° Le bacille d'Eberth, lorsqu'il a pénétré dans l'organisme, produit une substance toxique très active, laquelle agit sur les centres nerveux en déterminant un empoisonnement rapide qui amène la mort par *collapsus;*

2° En dehors des phénomènes toxiques généraux, communs à beaucoup d'autres poisons, la toxine typhique exerce une action très énergique sur toutes les muqueuses en général et sur la muqueuse entérique en particulier, en provoquant de violentes congestions veineuses, infiltrations embryonnaires étendues, hypertrophies des plaques de Peyer, œdèmes aigus des cellules épithéliales, détachement complet de l'épithélium intestinal, processus inflammatoire, hémorragies et ulcérations le long du canal digestif, surtout dans l'intestin grêle ;

3° Toutes ces altérations anatomiques, dont le canal digestif devient le siège, et qui se développent sous l'influence du poison typhique, indépendamment de la présence des microbes, sont accompagnées par des phénomènes objectifs présentant les analogies les plus étroites avec le tableau symptomatologique de la fièvre typhoïde humaine ;

4° Dans la fièvre typhoïde expérimentale, comme dans la fièvre typhoïde humaine, les bacilles d'Eberth ne se trouvent pas ordinairement dans le contenu intestinal; cela confirme davantage le fait que les lésions intestinales inhérentes à cette maladie ont une origine exclusivement toxique, et cela enlève toute valeur à la vieille idée selon laquelle la fièvre typhoïde devrait être considérée comme un processus infectieux d'origine, et à localisations intestinales ;

5° Cette absence des bacilles d'Eberth dans l'intestin de l'homme ou des animaux s'explique par les deux raisons suivantes : 1° parce que la fièvre typhoïde n'est qu'une *infection du système lymphatique;* c'est là seulement que le virus se localise de préférence, se multiplie et fabrique son poison; 2° parce que, dès que ce poison fait ressentir son influence sur les parois intestinales en déterminant le commencement des graves altérations anatomiques et fonctionnelles déjà décrites, le *B. coli* de l'intestin

devient pathogène, se multiplie en proportion extraordinaire et tend à rester le seul représentant de la flore intestinale en anéantissant toutes les autres espèces microbiques ;

6° Etant données les graves altérations anatomiques toxiques de la muqueuse intestinale, cet énorme développement que prend le *B. coli*, sous l'influence de la toxine typhique, constitue la cause première de ces infections et localisations secondaires par le *B. coli*, si connues et fréquentes dans la fièvre typhoïde humaine et expérimentale ;

7° Si cependant le *B. coli* émigre de l'intestin sous l'influence de la toxine typhique, lorsque l'animal est en partie déjà vacciné contre la fièvre typhoïde, il ne détermine jamais l'infection générale, mais, selon le degré d'immunité acquise par l'organisme, développe, dans les séreuses, des processus inflammatoires chroniques, localisés, plus ou moins graves, qui peuvent finir par la guérison ;

8° Les animaux vaccinés contre le bacille typhique le sont aussi contre le *bacterium coli;* ce dernier commence alors à disparaître même de l'intestin où il se trouve normalement, étant peut-être détruit par les mêmes cellules épithéliales de la muqueuse, qui en ce cas se comporteraient envers lui comme toute autre cellule phagocytaire de l'organisme vacciné.

Erratum. — Une omission typographique, à la page 701 de mon article *Les Vibrions des eaux* (ces *Annales*, octobre 1892), rend peu claire la méthode de préparation des milieux nutritifs employés pour l'isolement des vibrions : je crois nécessaire d'éclaircir mieux la technique de cette méthode.

On prépare un mélange nutritif concentré avec la composition suivante : gélatine, 20 grammes ; peptone sèche, 10 grammes ; chlorure sodique, 10 grammes ; nitrate potassique, 1 gramme ; eau distillée, jusqu'au volume total de 100 c. c.

Cette gélatine concentrée peut se conserver en grande quantité dans des tubes stérilisés. On choisit la proportion de 10-20 c. c. à peu près pour chaque tube ; dose suffisante pour transformer 100-200 c. c. d'eau à analyser, en solutions nutritives de la composition suivante : gélatine, 2 gr. ; peptone, 1 gr. ; chlorure sodique, 1 gr. ; nitrate potassique, 0gr,10 ; eau, 100 grammes.

EXPLICATION DE LA PLANCHE VIII

Fig. I. — Coupe transversale de l'intestin grêle d'un cobaye mort d'intoxication typhique aiguë (injection de toxine). Durcissement par le bichlorure de mercure; coloration sur lamelle par la méthode de M. *Nicolle* (bleu de Kühne et tannin). Gross. 900/1.

a. Sous-muqueuse;

b. *Muscularis mucosæ* infiltrée par des globules sanguins;

c. Muqueuse contenant les cryptes de Lieberkuhn, infiltrée par des globules sanguins et présentant des petits foyers de *B. coli*. On voit le même *B. coli* dans les culs-de-sac des glandes intestinales, qui présentent l'épithélium intact. Les villosités de la muqueuse sont presque complètement dénuées de leur épithélium prismatique, dont on voit des lambeaux détachés, dans le milieu de la cavité intestinale. Celle-ci est aussi encombrée par des microbes, des globules blancs, des cellules épithéliales, etc.

Fig. II. — Coupe transversale d'une plaque de Peyer chez un cobaye mort d'intoxication typhique aiguë (injection de toxine). Même durcissement et même coloration Gross. 115/1.

a. Couche musculaire interne et externe;

b. Sous-muqueuse énormément infiltrée ;

c. *Muscularis mucosæ ;*

d. Vaisseaux sanguins dilatés;

e. Follicules lymphatiques hypertrophiques;

f. Couche glandulaire de la muqueuse;

g. Epithélium de la muqueuse en partie détruit.

RECHERCHES COMPARATIVES SUR LES PSEUDOTUBERCULOSES BACILLAIRES

ET UNE NOUVELLE ESPÈCE DE PSEUDOTUBERCULOSE

Par le Dr Hugo PREISZ

Chef de l'Institut bactériologique d'État à Budapest.

En 1891, j'ai publié dans le *Journal de médecine vétérinaire et de zootechnie,* en collaboration avec M. L. Guinard, chef des travaux de M. Arloing, à Lyon, un travail sur un cas de pseudotuberculose observé chez le mouton. C'était le premier cas observé chez cette espèce animale, et cette pseudotuberculose était causée par un microorganisme bien différent du bacille de Koch. Nous pensions que ce microbe était identique à ceux décrits par les auteurs français, allemands et italiens comme agents de pseudotuberculose ; je soupçonnais, cependant, à raison de certaines propriétés de ce bacille, que notre pseudotuberculose était probablement différente de celles décrites jusqu'à présent.

Nous disions qu'on ne pourrait déterminer cette pseudotuberculose et la distinguer des autres que par une étude comparative, anatomique et bactériologique, des diverses pseudotuberculoses connues, d'autant plus que les descriptions ne permettent pas toujours de se faire une idée nette de la maladie et surtout du bacille causal. En conséquence, pour classer notre pseudotuberculose du mouton, il aurait fallu connaître toutes les autres, tâche d'autant plus difficile, qu'on ne savait même pas jusqu'à quel point les différentes pseudotuberculoses connues étaient différentes ou semblables.

Cette circonstance m'a déterminé à étudier comparativement la bactériologie et l'anatomie de quelques espèces de pseudotuberculose trouvées en différents endroits par différentes personnes. Rappelons les principaux auteurs qui se sont occupés de cette question.

Historique. — Les premiers qui aient parlé de pseudotuberculose sont MM. Malassez et Vignal. Ils ont provoqué leur « tuberculose zoogléique » en inoculant aux animaux un nodule caséeux provenant du bras d'un enfant, qui était mort de méningite tuberculeuse. Les tubercules provoqués de cette manière ressemblèrent tout à fait aux tubercules véritables ; ils présentèrent même des cellules épithélioïdes et géantes. Celles-ci ne contenaient pas le bacille de Koch, mais des zooglées formées par des cocci isolés ou en chaînette, ne se colorant que par le bleu de méthylène. Des inoculations réitérées finirent par donner des tubercules à bacilles de Koch, et MM. Malassez et Vignal, à la suite de ces résultats, supposèrent que leur coccus en zooglée n'était qu'une forme de transition de ce bacille. Quelques auteurs français ont admis la même hypothèse.

Ainsi, M. Chantemesse (1887) a provoqué la pseudotuberculose par l'inoculation d'une ouate ayant servi à filtrer de l'air provenant d'une salle de tuberculeux; MM. Grancher et Ledoux-Lebard (1889) ont obtenu leur pseudotuberculose par l'inoculation aux animaux du produit de filtration d'une culture pure du bacille de Koch à travers une couche de 15 centimètres de terre. Dans les tubercules ainsi provoqués, ces auteurs ont trouvé un coccus semblable à celui de MM. Malassez et Vignal; ils ont, en plus, obtenu des cultures. Ce coccus, après quelques passages sur le cobaye, ne forme plus de zooglées. D'ailleurs, MM. Grancher et Ledoux-Lebard considèrent leur pseudotuberculose comme identique à celle de Malassez et Vignal, et à celle de Charrin et Roger, dont je vais m'occuper.

Je réunis, sans m'inquiéter de l'ordre chronologique, les recherches des auteurs précédents, parce qu'on voit que la matière, avec laquelle ils ont provoqué la pseudotuberculose, semblait avoir une relation avec la véritable tuberculose : nodule caséeux d'un enfant prétendu tuberculeux, air expiré par des phtisiques, produit de filtration du bacille de Koch. Naturellement, nous n'attachons pas grande importance à ces coïncidences, et nous concluons, simplement, que le bacille de la pseudotuberculose est très répandu.

MM. Charrin et Roger (1888) ont trouvé dans le foie et la rate d'un cobaye des nodules tuberculiformes, provoquant chez le lapin, le cobaye et la souris, des nodules semblables, avec des

bacilles qui ne forment pas de zooglées et se colorent avec peine. Ils nommèrent cette maladie pseudotuberculose bacillaire, et ne l'identifièrent pas avec celle de Malassez et Vignal, ou celle d'Eberth.

Un peu plus tard, M. Dor trouvait une pseudotuberculose chez le lapin et en cultivait le bacille.

Parmi les auteurs français, M. Nocard a eu le mérite, non seulement d'observer quelques cas de pseudotuberculose, mais de comparer entre elles les pseudotuberculoses de différents auteurs. Il a ainsi jeté un peu de lumière sur cette question jusqu'alors embrouillée.

M. Nocard (1885) a observé dans une basse-cour une pseudotuberculose causée par des bacilles semblables à ceux de Malassez et Vignal.

Quatre années plus tard, il a provoqué chez un cobaye, avec le jetage d'une vache suspecte de tuberculose, une pseudotuberculose, dont les bacilles semblaient identiques à ceux de Malassez et Vignal. La vache abattue ne montra ni tuberculose ni pseudotuberculose.

Enfin, en 1889, M. Nocard a relaté chez des lapins une épizootie, qui ressemblait anatomiquement et bactériologiquement à celle qu'il avait observée auparavant. A cette occasion, il fit des recherches comparatives, à la suite desquelles il conclut que la pseudotuberculose observée par lui-même chez les lapins, celle provenant de la vache, ainsi que celle de Charrin-Roger et de Dor, sont identiques, c'est-à-dire sont causées par le même microorganisme. Si nous nous rappelons que MM. Grancher et Ledoux-Lebard ont reconnu l'identité de leur bacille avec celui de MM. Charrin et Roger, nous pouvons conclure que toutes ces pseudotuberculoses peuvent être identiques.

A peu près en même temps, M. Courmont publiait plusieurs mémoires sur une sorte de pseudotuberculose, dont le bacille diffère par plusieurs points de ceux que nous venons de rappeler; M. Courmont partit des lésions tuberculeuses de la plèvre d'une vache, ne contenant pas de bacille de Koch.

Il est important de dire de suite que l'inoculation de ces tubercules de la vache engendrait chez le lapin des lésions tuberculeuses, mais tuait les cobayes sans donner de tubercules, tandis que la culture du bacille en question, âgée de vingt jours,

causait chez les cobayes et les rats blancs une tuberculose typique, mais tuait les lapins sans lésions tuberculeuses.

Parmi les travaux allemands, ceux de M. Eberth et M. Pfeiffer méritent d'être mentionnés.

M. Eberth (1886) observa chez un lapin, mort spontanément, des nodules tuberculiformes dans le foie, la rate et les reins, au centre desquels se trouvaient des amas de bacilles se colorant seulement par la méthode de Löffler, courts et épais, formant parfois des chaînettes comme ceux de MM. Malassez et Vignal. M. Eberth croit son cas identique à celui des deux auteurs ci-dessus nommés, mais il ne cultiva pas son bacille.

Presque en même temps que M. Nocard, M. Pfeiffer (1888) publiait une brochure sur la pseudotuberculose des rongeurs, dans laquelle il décrit une maladie tuberculiforme chez un cheval suspect de morve; l'inoculation des lésions pathologiques provoqua chez le cobaye une pseudotuberculose; comme il ne réussit à trouver, dans les organes altérés de ce cheval, ni les bacilles de la morve ni ceux de la pseudotuberculose, il faut se demander si la maladie du cheval n'était pas la morve, et si le bacille de la pseudotuberculose n'était pas simplement mêlé par hasard à la matière morveuse inoculée, ou si la maladie du cheval n'était pas elle-même la pseudotuberculose ; mais cette seconde hypothèse n'est pas vraisemblable, car les tentatives d'inoculation qu'a faites M. Pfeiffer pour infecter des chevaux avec son bacille restèrent sans résultats. Le bacille de cette pseudotuberculose (de Pfeiffer) étant assez bien étudié, nous en reparlerons pour le comparer aux autres. Remarquons simplement, ici, que M. Pfeiffer identifie son bacille avec celui d'Eberth et de Malassez et Vignal.

M. Zagari (1889) a trouvé chez quatre cobayes des lésions tuberculiformes avec bacilles en chaînettes et en zooglées au centre ; par l'inoculation en séries, la maladie devenait plus traînante, et, au lieu d'offrir des tubercules gros et rares, elle présentait des nodules plus nombreux et plus petits. M. Zagari pense que son cas est identique à ceux de MM. Malassez et Vignal, Charrin-Roger, Eberth et Manfredi.

M. Parietti (1890) a obtenu la pseudotuberculose en inoculant du lait dans un tout autre but à des cobayes ; le bacille contenu dans ces pseudotubercules, qu'il cultiva, était plus court et

« peut-être » plus mince que le bacille de Koch, il formait des chaînettes et se décolorait par la méthode de Gram.

Dans ces derniers temps, M. Hayem a observé chez l'homme un cas de pseudotuberculose, caractérisé pendant la vie par une gastroentérite, par du vomissement, de la diarrhée, un état algide et par de la pigmentation de la peau. A l'autopsie, M. Hayem a noté de la dégénérescence caséeuse des glandes surrénales et de la tuméfaction des glandes solitaires de l'intestin. Les divers organes, le sang, les glandes surrénales, les plaques de Peyer ont fourni un bacille, qui, selon Hayem, est identique avec ceux qu'ont décrits MM. Nocard, Charrin et Roger.

Quelque temps auparavant, MM. du Cazal et Vaillard publiaient un autre cas humain, caractérisé par la présence de nodules de la grosseur d'un grain de mil à celle d'une lentille, sur le péritoine et dans le pancréas. Ces nodules contenaient un court bacille.

Ces cas nous prouvent que la pseudotuberculose, quelle qu'en soit la nature, existe chez l'homme. Il est donc probable, *a priori*, que certains cas de tuberculose, qu'on regarde comme étant tuberculeux ou au moins comme tuberculeux « sans bacilles », appartiennent au groupe des pseudotuberculoses.

M. Legrain a publié une note sur une pseudotuberculose obtenue chez le lapin par l'inoculation du crachat d'un phtisique. Le bacille trouvé dans ces pseudotubercules était court, se décolorait par la méthode de Gram, prenait la couleur aux deux bouts mieux qu'au milieu, et liquéfiait la gélatine. Avec de fortes doses, ce bacille tuait les animaux par septicémie, mais les petites doses donnaient au lapin une pseudotuberculose. Ce cas est bien semblable à celui qu'ont décrit MM. du Cazal et Vaillard.

Quant à la « granulie progressive » de M. Manfredi, ainsi que la « syphilis des animaux » décrite par Disse et Taguchi, elles ressemblent par quelques points à la pseudotuberculose des auteurs; nous en dirons quelques mots plus loin.

Comparaisons expérimentales. — Après cette courte esquisse de la bibliographie du sujet, je vais parler des résultats de mes propres recherches, que j'ai faites parallèlement au point de vue bactériologique et anatomique. Malheureusement, je n'ai pu me procurer pour ces recherches les bacilles de toutes les pseudo-

tuberculoses ci-dessus mentionnées; je n'ai eu que ceux de MM. Nocard, Pfeiffer, Parietti et Zagari, qui ont été trouvés en quatre endroits divers (Paris, Wiesbaden, Pavie, Naples).

Il est tout naturel que la même espèce bacillaire observée en divers endroits et par divers savants soit décrite différemment; des changements légers dans la composition chimique des milieux nutritifs suffisent à faire pousser différemment le même bacille. C'est donc d'une façon rigoureusement parallèle que j'ai comparé ensemble le bacille de ces quatre pseudotuberculoses de diverses provenances, sur les milieux nutritifs, sous le microscope, par inoculation aux animaux et dans les tissus, et je peux avancer que je n'ai pu trouver aucune différence entre elles; ce que j'ai constaté sur l'une des quatre sortes de pseudotuberculose, je l'ai trouvé également chez les autres; aussi je me dispense de décrire ces recherches comparatives, et je me restreindrai à énumérer l'ensemble des propriétés communes, pour compléter les descriptions des auteurs sus-nommés et les rectifier lorsque je le croirai nécessaire.

La morphologie du bacille peut être bien étudiée en broyant un pseudotubercule sur le couvre-objet et en colorant avec une solution aqueuse d'une couleur d'aniline quelconque; de cette manière les bacilles se colorent assez facilement (ce qui est très difficile dans les coupes) et se montrent séparés et distincts; on voit alors immédiatement qu'il ne s'agit pas d'un coccus, mais d'un bacille, gros, aux bouts arrondis, deux, trois fois plus long que large, quelquefois même plus long, parfois par paires; les formes sphériques et ovoïdes sont relativement rares.

Si nous ensemençons un peu d'un pseudotubercule frais sur une surface de gélose à 37°5, il se développe, déjà dans les premières vingt-quatre heures, des colonies, qui sont d'abord transparentes, luisantes et lisses; plus tard elles s'étendent, ne restent transparentes qu'à la périphérie, et finissent par prendre une teinte blanc sale, ou jaunâtre, verdâtre; à la surface les colonies sont lisses ou en cercles concentriques, et leur étendue atteint au bout de trois, quatre semaines la grosseur d'une lentille ou même plus; l'eau de condensation de la gélose se trouble, et il se forme un sédiment assez considérable.

Une culture en strie sur gélose s'étend en haut moins largement qu'en bas, où elle peut occuper toute la largeur; elle est

grasse, luisante, pas granuleuse ou gluante, en général elle n'est pas fort caractéristique. Les cultures un peu vieilles répandent une mauvaise odeur, assez forte, qui est plus caractéristique que la morphologie de la culture. A la surface des cultures sur gélose paraissent des points irisés, qui plus tard recouvrent et dépassent même la colonie.

Outre cela, dans la profondeur et partant de la culture, apparaissent des cristaux assez gros parfois, en nombre considérable ; leur longueur peut atteindre un centimètre. Ils sont formés par du phosphate de chaux (d'après M. Liebermann). De grands cristaux et des taches irisées comme celles ci-dessus mentionnées, qui sont également formées par de petits cristaux, peuvent être trouvés aussi chez d'autres bactéries, mais ni en aussi grande quantité, ni avec autant de fréquence. Des cultures sur gélose tout à fait anciennes (d'une année) deviennent foncées, elles prennent une teinte gris-rougeâtre terne, semblable à de la nacre ; elles montrent sous le microscope beaucoup de cristaux de choléstérine et de fins petits cristaux en forme d'aiguilles.

Sur la gélatine à 10 0/0, le bacille pousse déjà à la température ordinaire, et forme en dix-huit, vingt heures des colonies bien visibles à l'œil nu ; la gélatine ne se liquéfie jamais, mais dans les cultures plus anciennes, la région qui entoure la culture devient opaque, lactiforme. Ensemencé sur la plaque de gélatine à 10 0/0, le bacille forme en vingt-quatre heures des colonies, qui atteignent après trois, quatre jours le maximum de leur étendue ; sur ces plaques les colonies profondes sont de la grandeur d'un grain de pavot, rondes ; la couleur en est jaunâtre, les bords nets; les colonies superficielles sont beaucoup plus grandes, d'un diamètre de 1,5 à 2 millimètres, avec des bords irréguliers et souvent d'une forme irrégulière, d'une couleur blanc grisâtre, ou blanc sale. Sous le microscope, les superficielles, ainsi que les profondes, sont brun foncé, granuleuses; les dernières laissent souvent apercevoir un anneau concentrique, qui sépare le centre plus brun de la périphérie plus claire de la colonie. Au bout de quelques jours toute la plaque de gélatine se trouble.

Dans du bouillon peptonisé, le bacille pousse très bien, en le troublant considérablement en dix-huit heures ; sur les parois et au fond des tubes se forment des flocons ; après plusieurs

jours, quand le bouillon est épuisé, ces flocons se déposent et le bouillon s'éclaircit sans former une membrane à la surface.

Sur un sérum de bœuf gélatinisé le bacille pousse assez bien, mais moins que sur gélose ou gélatine; il y forme le long de la ligne d'inoculation une étroite strie, visible surtout par son relief, et dont la largeur ne surpasse pas 4 à 5 millimètres, même en deux, trois semaines.

En ajoutant à la gélose ou à la gélatine de la glycérine, la végétation est beaucoup plus accélérée et plus abondante.

Tous ces caractères ont été trouvés identiques après des recherches réitérées avec les bacilles des quatre sortes de pseudotuberculose; ils se complètent par l'observation de ces bacilles dans la goutte suspendue, qui prouve mieux que toute autre méthode leur identité.

Après l'ensemencement dans une goutte de bouillon peptonisé suspendue, à une température de 37°5, au bout de vingt-quatre heures, au fond de la goutte s'amasse un point blanchâtre ; sous le microscope on voit dans la goutte des bacilles isolés, courts, et des chaînettes longues occupant la plus grande partie du champ; ce sont ces dernières qui sont caractéristiques du bacille de cette pseudotuberculose. Les bacilles isolés sont mobiles, ils s'agitent sans direction, tandis que les chaînettes sont presque tout à fait immobiles; seulement, les bacilles isolés qui les entourent semblent leur communiquer quelques oscillations. Les bacilles formant les chaînettes sont ou ovales, ou en courts bâtonnets deux fois plus longs que larges, plus étroits au milieu, ayant la forme d'un cocon. Dans une goutte âgée de trois, quatre jours, les bacilles semblent subir une dégénérescence qui fait gonfler les chaînettes ou quelques-uns de ses individus : en conséquence, le diamètre des derniers peut devenir cinq, six fois plus grand. Au premier coup d'œil la figure ressemble beaucoup à celle du streptococcus, et la dénomination « streptobacille » de M. Dor semble vraiment bien choisie; les bacilles d'une goutte âgée de plusieurs jours offrent des granulations réfringentes dans le plasma, auparavant homogène.

Autant il est facile de montrer les bacilles sur le couvre-objet, autant il est difficile de les faire voir dans des coupes, et j'avoue d'avance que je n'y ai jamais parfaitement réussi ; la cause

en est probablement dans la facilité de coloration et de décoloration de ces bacilles.

Avec la méthode de Gram ou de Gram-Weigert, je n'ai jamais réussi à colorer les bacilles, même en opérant avec grand ménagement; j'ai eu le même insuccès avec la méthode de Löffler, quand j'ai décoloré avec de l'acide acétique et de l'alcool. J'obtins une coloration médiocre en colorant avec le bleu de Löffler, et en décolorant avec de l'acide acétique à 1/2 0/0, lavant à l'eau distillée, séchant la coupe selon la méthode d'Unna, et la montant au xylol et au baume; de même en colorant au bleu de méthylène en solution dans le carbonate d'ammonium (1 : 100) et en décolorant avec de l'aniline et du xylol (2 : 1).

Dans des coupes ainsi traitées, les bacilles ont vraiment l'aspect des cocci; quant à leur arrangement dans le pseudotubercule, je n'ai pas pu voir des amas enclos d'une matière hyaline rappelant des zooglées, bien que parfois on trouve au centre des pseudotubercules des tas de bacilles, qui sont à la périphérie toujours plus rares et forment parfois de courts chapelets.

Comparaisons anatomiques. — Quant à l'histologie et l'histogénie de ces pseudotubercules, les quatre pseudotuberculoses diffèrent aussi peu entre elles que leurs bacilles; mes recherches sur ce point ont été faites avec des coupes de foie du cobaye.

Le pseudotubercule est engendré principalement par des cellules migratrices, mais il semble que les cellules propres des organes participent aussi à sa formation.

Le pseudotubercule dans le foie se fait reconnaître au premier abord par la dégénérescence granuleuse des cellules du foie, par la faible coloration de leurs noyaux et par l'apparition de petites cellules sphériques. Avec l'agrandissement du pseudotubercule, les vaisseaux capillaires des îlots hépatiques se dilatent, se remplissent de cellules à un ou à plusieurs noyaux, du caractère des petites cellules épithéliformes; par conséquent les colonnes des cellules hépatiques s'amincissent, leurs cellules se détachent en subissant diverses altérations; le plus souvent elles deviennent des grumeaux réfringents, qui prennent aisément les couleurs d'aniline, surtout la safranine et l'éosine; quelquefois au contraire les cellules hépatiques du pseudotubercule restent incolores, hyalines, leur noyau se ratatine et

brunit. Une semblable altération se voit d'ailleurs aussi dans les véritables tubercules et dans leur voisinage. Encore plus tard, ces cellules hépatiques disparaissent sans doute. Au centre du pseudotubercule on remarque parfois plusieurs taches incolores, lesquelles, vues avec l'objectif à immersion, sont composées de petites granulations brillantes, qui sont des bacilles se colorant très difficilement.

D'ailleurs la plus grande partie du pseudotubercule est formée de petites cellules en telle quantité, que leur examen présente d'assez grandes difficultés, même dans des coupes très minces ; ces cellules sont de deux sortes, les unes petites, pourvues d'un noyau unique ou de ses débris toujours bien colorés, cellules semblables à celles du pus ; les autres, plus grandes, renferment deux, trois, ou plusieurs noyaux ovales, vésiculeux. Une partie de ces dernières semble être des cellules migratrices, car on en voit dans l'intérieur des capillaires et des gros vaisseaux ; l'autre partie semble au contraire dériver des cellules endothéliales.

Ce centre du tubercule si riche en cellules est souvent entouré d'une zone à peine colorée, formée par des cellules hépatiques dégénérées. Je n'ai jamais vu des cellules géantes de Langhans, avec centre granuleux.

Le pseudotubercule et le tubercule véritable diffèrent donc surtout au début de leur développement. Tandis que le tubercule s'édifie par multiplication des cellules propres des tissus, à laquelle ne se joignent que plus tard des cellules migratrices, le pseudotubercule est déjà composé immédiatement par des cellules migratrices, bien que les cellules endothéliales des petits vaisseaux participent aussi à sa formation. Le tubercule véritable est donc un produit hyperplastique, tandis que le pseudotubercule est surtout exsudatif, sans toutefois l'être exclusivement.

Différences entre les résultats de divers auteurs. — Après avoir démontré par mes recherches histologiques et bactériologiques l'identité des pseudotuberculoses décrites par MM. Nocard, Parietti, Pfeiffer et Zagari, je dois essayer d'expliquer les différences parfois assez considérables des travaux de ces auteurs.

Ainsi M. Parietti décrit son bacille comme plus court et

« peut-être » plus mince que celui de Koch; j'avoue que je n'ai pu constater cela sur la culture que m'a envoyée M. Parietti; il est vrai que son bacille est plus court que celui de Koch, mais il est plus gros, comme les trois autres bacilles.

M. Nocard attribue à son bacille un mouvement rapide, et M. Parietti estime que le sien est également mobile, quoique beaucoup moins, tandis que les bacilles de Zagari et Pfeiffer sont immobiles. M. Pfeiffer a observé que les chaînettes sont immobiles, tandis que les bacilles isolés exécutent un mouvement moléculaire sans locomotion notable. Pour moi, je suis d'accord avec M. Pfeiffer sur les mouvements des quatre sortes de bacilles; je m'explique l'avis contraire de M. Nocard par ce fait, qu'il n'a observé que des bacilles isolés, lesquels ont réellement quelques mouvements.

M. Pfeiffer a trouvé qu'il se forme autour des colonies de son bacille sur gélatine des petits cristaux en aiguilles; il a aussi remarqué des cristaux semblables dans les cultures en bouillon; il les considère comme caractéristiques et y attache une grande importance au point de vue diagnostique. M. Parietti mentionne la formation de semblables cristaux dans les cultures en piqûre sur gélatine, tandis que M. Pfeiffer n'en a jamais remarqué dans de pareilles cultures, et que MM. Nocard et Parietti n'en font aucune mention.

Pour moi, je n'ai vu ni chez le bacille de M. Pfeiffer, ni chez celui de M. Parietti, la formation de semblables cristaux autour des colonies. D'ailleurs, l'apparition d'une couronne semblable de cristaux peut être observée chez d'autres bacilles non pathogènes.

Quant à l'odeur des cultures de ce bacille, MM. Nocard, Pfeiffer et Zagari n'en parlent pas, tandis que, selon M. Parietti, les cultures en gélatine répandent une odeur dégoûtante, contrairement aux cultures en bouillon et sur gélose. Sur ce point, je peux affirmer que les quatre sortes de bacilles développent une odeur semblable, surtout sur gélose, tandis que les cultures sur gélatine sont à peine odorantes. J'arrive à la végétation de ce bacille sur pomme de terre, car elle est assez caractéristique.

D'après MM. Nocard, Pfeiffer et Zagari, le bacille ne pousse sur la pomme que très chétivement et lentement, formant des colonies blanc jaunâtre; selon M. Parietti, il pousse avec une

couleur pâle jaunâtre, et la partie inoccupée de la pomme brunit.

D'après mes observations, des cultures anciennes transportées sur pomme de terre ne poussent pas en général, mais, emprunté à une culture récente, le bacille forme des colonies, qui sont déjà visibles au bout de vingt-quatre heures à 37°,5 ; elles sont d'abord jaune pâle, puis elles deviennent saillantes, abondantes et rouge brunâtre ; la pomme de terre tout entière se colore en noir verdâtre. Ces cultures ressemblent donc à celles du bacille de la morve. Ajoutons que le bacille pousse de même sur des pommes de terre franchement acides.

Une propriété des cultures sur gélatine, qui n'a été signalée que par M. Parietti, mérite d'être mentionnée, bien qu'elle puisse être observée également chez d'autres bactéries ; la gélatine se trouble autour des colonies en piqûres, en stries ou sur plaque.

M. Nocard a dit que son bacille est en même temps aérobie et anaérobie ; il a probablement voulu dire simplement que son bacille peut végéter avec peu d'oxygène, car nous avons remarqué que ce bacille pousse dans la profondeur de la piqûre et de la plaque de gélatine, même très mince, beaucoup plus chétivement qu'à la surface.

Voilà pour le bacille lui-même ; passons maintenant aux observations anatomiques et histologiques comparatives.

Les détails histologiques sont d'accord quant aux cellules rondes, lymphoïdes et aux cellules épithélioïdes ; les cellules géantes observées par MM. Nocard et Zagari pouvaient être des éléments divers ; d'abord elles pouvaient avoir été des cellules endothéliales ou migratrices à plusieurs noyaux, comme nous l'avons mentionné plus haut ; elles pouvaient encore avoir été simulées par des coupes transversales de capillaires remplis de cellules endothéliales agrandies et à noyaux multiples. Dans le foie ce sont les petits vaisseaux biliaires, dont la coupe transversale peut être prise facilement pour une cellule géante, surtout si leur vide s'annule par la pression des cellules voisines. Ni M. Nocard ni M. Zagari n'ont probablement rencontré des cellules géantes semblables à celles qu'on voit dans les vrais tubercules ; quant à moi je n'en ai pas aperçu, bien qu'ayant observé une multitude de coupes.

Au sujet de la coloration des bacilles dans des coupes, les auteurs sont tous d'accord pour dire qu'ils se colorent très diffi-

cilement. La démonstration des bacilles dans les coupes est d'autant plus difficile, que les pseudotubercules sont plus anciens, ainsi que l'a remarqué M. Pfeiffer.

Des zooglées, c'est-à-dire des amas bacillaires renfermés dans une substance homogène, ne sont décrites que par MM. Nocard et Zagari; M. Nocard, en parlant des coupes, fait remarquer que la substance homogène, qui réunit les cocci, reste incolore, et, de plus, que ces zooglées ne se colorent qu'à leur périphérie.

J'ai observé que les bacilles sont renfermés en général dans les cellules mêmes, qu'ils remplissent parfois complètement; les amas bacillaires peuvent être limités nettement par les contours des cellules, mais parfois on en trouve aussi entre les cellules, ne formant pas d'amas trop épais; on peut facilement y distinguer des formes oblongues ou des formes rondes et de courtes chaînettes. Je n'ai jamais vu de groupes bacillaires épais enlisés dans une substance homogène; il n'est pas impossible que la propriété de former des zooglées soit facultative et puisse disparaître dans certaines circonstances.

D'accord avec les auteurs, je peux aussi affirmer que le bacille de la pseudotuberculose se trouve tantôt dans le sang et tantôt en est absent; on n'a jamais réussi à le déceler avec le microscope, mais seulement par les cultures.

Nous venons de prouver que la pseudotuberculose observée en divers lieux et en divers temps par MM. Nocard, Parietti, Pfeiffer et Zagari, est causée par le même bacille, et qu'elle est caractérisée par des altérations anatomiques semblables; en outre, dans l'introduction de cette note, nous avons rappelé que M. Nocard a comparé la pseudotuberculose de MM. Charrin-Roger et de M. Dor avec les deux sortes qu'il eut occasion d'observer, et que, pour lui, ces maladies, de quatre origines distinctes, sont dues à des bacilles semblables. Nous n'hésitons pas à nous appuyer sur les observations d'un spécialiste si autorisé, pour dire que la pseudotuberculose décrite par MM. Charrin-Roger et Dor est identique aux quatre autres étudiées comparativement par nous.

Reste à se demander qui a le mérite d'avoir découvert cette pseudotuberculose et notamment son bacille? Nous ne voulons pas éluder cette question, et cela d'autant moins que certains auteurs n'ont pas prêté assez d'attention aux travaux de leurs

prédécesseurs sur ce sujet. La publication de M. Pfeiffer sur la pseudotuberculose des rongeurs, publiée en août 1889, est passible de ce reproche. Non seulement ce savant donne les travaux de MM. Charrin-Roger et Dor parus en 1888 comme « très superficiels » et comme tels, « qu'il est impossible de dire si les auteurs ont observé son bacille ou tout autre », mais il a omis de citer les recherches de M. Nocard datant déjà de 1885 et du mois de mars 1889; M. Pfeiffer ne fait pas mention non plus des travaux de MM. Malassez-Vignal et d'Eberth, qui, s'ils n'ont pas cultivé le bacille, l'ont en tous cas observé dans les tissus; MM. Charrin-Roger, Dor, Nocard, ont cependant cultivé le bacille trouvé par eux avant l'apparition de la monographie de M. Pfeiffer; ils ont, en plus, engendré la maladie en inoculant des cultures pures, et ils nous ont fait connaître plusieurs caractères de ce bacille, qui est celui de M. Pfeiffer. Il faut rendre la priorité aux auteurs auxquels elle est due.

Autres pseudotuberculoses. — Parmi les autres pseudotuberculoses, seule, celle de MM. Grancher et Ledoux-Lebard peut être rapprochée presque avec certitude de la précédente, non seulement en raison des descriptions et des dessins de ces auteurs, qui correspondent tout à fait à ceux de M. Nocard, mais aussi parce qu'eux-mêmes, comparant leur bacille avec celui de MM. Charrin-Roger, les ont trouvés identiques.

Le bacille trouvé par MM. du Cazal et Vaillard, dans les lésions tuberculiformes de l'homme, ne peut être regardé comme identique à celui que nous venons de décrire, puisqu'il en diffère par deux caractères essentiels: il liquéfie la gélatine et n'est pas pathogène pour le cobaye.

Le cas de M. Hayem, observé aussi chez l'homme, peut-il être mis sur le même tableau? Sur ce point les descriptions bactériologiques sont insuffisantes et ne nous donnent aucun appui. Aussi, nous ne croyons pas fondée l'opinion de l'auteur, qui identifie son cas avec l'infection coccienne de Manfredi, et avec la pseudotuberculose de MM. Nocard et Charrin-Roger.

Il faut maintenant dire quelques mots des bacilles de la syphilis de Disse-Tagucchi, et de la « granulie progressive » de Manfredi, d'autant plus que M. Baumgarten, dans son *Manuel bactériologique,* penche à les identifier avec ceux de la pseudotuberculose de MM. Eberth, Malassez-Vignal et Chantemesse.

Disse et Tagucchi ont trouvé dans le sang des individus syphilitiques des bacilles, dont l'inoculation a provoqué chez les animaux « des lésions syphilitiques caractéristiques ». Abstraction faite de la valeur des observations de ces auteurs, nous pouvons prétendre que leur bacille est différent de celui de la pseudotuberculose, parce que le premier est bien colorable avec le Gram, méthode qui ne réussit jamais avec le bacille de Charrin-Roger, Dor et Nocard.

Le bacille trouvé par Manfredi chez deux enfants pneumoniques, à ce qu'on peut juger par les descriptions, pourrait être assimilé au bacille en question quant à sa morphologie et ses cultures; seule, sa facile coloration n'est pas compatible avec cette identité. Manfredi a réussi à colorer son bacille (qu'il nomme coccus) dans les coupes avec du bleu de méthylène en solution aqueuse, ou avec la méthode de Gram faite avec précaution, chose qui n'a réussi à personne avec le bacille de la pseudotuberculose. Manfredi remarque, d'ailleurs, qu'après un certain temps les bacilles ne se colorent que difficilement, qu'ils forment parfois des zooglées, et qu'ils sont renfermés le plus souvent dans le plasma, tous caractères qui sont propres au bacille de la pseudotuberculose étudiée ci-dessus. Pour ma part, je ne doute pas que le « coccus » de Manfredi soit identique avec le bacille de la pseudotuberculose: du moins les altérations anatomiques qu'il provoque sont les mêmes.

Quant aux cas dans lesquels les bacilles n'ont pas été examinés en cultures, mais seulement au microscope, on n'en peut naturellement juger qu'avec plus ou moins de vraisemblance: tels sont le cas bien connu de MM. Malassez et Vignal et celui de M. Eberth, « du bacille de la pseudotuberculose du lapin ».

D'après MM. Malassez et Vignal, les tubercules zoogléiques sont d'abord composés par des cellules lymphoïdes, plus tard par des cellules épithélioïdes, entre celles-ci par quelques cellules géantes; au centre des tubercules, les bacilles forment parfois des zooglées; parfois ils forment des amas moins épais ou des chaînettes; quelquefois ils sont renfermés dans des cellules géantes, ce qui, d'après MM. Malassez et Vignal, n'est qu'une apparence. Leurs bacilles ne se coloraient qu'avec du bleu de méthylène de Berlin, et avec difficulté. On voit donc que la maladie et ses bacilles répondent à la pseudotuberculose de

MM. Charrin-Roger; leurs dessins nous présentent des bactéries sphériques et oblongues ou en cocon, parfois en chaînettes; les cellules géantes de ces auteurs n'étaient pas selon toute vraisemblance des cellules géantes de Langhans, mais des cellules à plusieurs noyaux dérivées de l'endothélium ou des cellules migratrices; la formation des zooglées n'a pas été non plus toujours observée par eux. Mais il est très surpre-surprenant que, sur vingt essais de culture sur le sérum, MM. Malassez et Vignal n'en aient réuni qu'un, qui a donné au bout de plusieurs jours une culture ayant la forme d'une petite écaille blanche sèche, tandis que nous savons, par ce qui précède, que le bacille de la pseudotuberculose étudié par nous pousse dans tous les milieux vite et abondamment; à part cela, il est très vraisemblable que MM. Malassez et Vignal ont expérimenté avec la même maladie, qu'ont observée plus tard MM. Charrin-Roger, Nocard, Dor et d'autres. Nous sommes du même avis sur la pseudotuberculose de M. Eberth; il n'a observé ni zooglées, ni cellules géantes, mais un bacille en tout semblable à celui de MM. Malassez et Vignal, qu'il n'a pas essayé de cultiver.

Pour être complet, nous ajouterons que M. Toussaint a déjà trouvé, avant la découverte du bacille de Koch, dans le sang d'une vache tuberculeuse, un micrococcus, qui pouvait former des lésions tuberculiformes. M. Toussaint a cultivé ce coccus et a réussi parfois à provoquer des lésions tuberculiformes; mais, comme il ne l'a cultivé que dans du bouillon, il n'opérait sans doute pas avec des cultures pures, et cette tuberculose était vraisemblablement causée par le bacille de Koch contenu dans le bouillon en même temps que le coccus; par conséquent, le cas de M. Toussaint n'est pas du tout apte à la comparaison avec la pseudotuberculose de Charrin-Roger etc.; la pseudotuberculose décrite par M. Legrain n'est pas non plus identique à la dernière, puisque son bacille liquéfie la gélatine.

Après avoir parcouru, croyons-nous, toute la bibliographie se rapportant à la pseudotuberculose, nous pouvons résumer ainsi les résultats de nos recherches comparatives.

Les maladies infectieuses, qui ont été découvertes en divers endroits et décrites dans l'espace de trois années à peine, chronologiquement par MM. Charrin et Roger, Dor, Nocard, Pfeiffer, Zagari, Parietti, et qu'ils ont dénommées différemment (tuber-

culose zoogléique, tuberculose streptobacillaire, pseudotuberculose bacillaire), sont toutes la même maladie, parce qu'elles sont toutes provoquées par le même bacille. A cause de la ressemblance anatomique de cette maladie avec la tuberculose véritable, nous avons accepté la dénomination de « pseudotuberculose » qui exprime, mieux que toute autre, que cette maladie ressemble à la tuberculose, mais qu'elle ne l'est pas.

Le nom de « tuberculose zoogléique » ne semble pas être des mieux choisis, car la formation de zooglées, si c'est en général une propriété de notre bacille, n'est pas constante, comme l'ont remarqué déjà MM. Malassez et Vignal, à qui l'on doit cette dénomination.

Puisque cette pseudötuberculose se trouve surtout chez le lapin et le cobaye, et puisque nous connaissons déjà, jusqu'à présent, plusieurs maladies semblables à la première au point de vue anatomique, mais différentes au point de vue étiologique, nous proposons de dénommer cette maladie « la pseudotuberculose des rongeurs (*pseudotuberculosis rodentium*), et d'appeler avec M. Dor *strepto-bacille* son agent producteur, car ce terme rappelle un des caractères importants de ce bacille, celui de se présenter dans les cultures en bouillon sous l'aspect de chaînettes.

Ce streptobacille ne se trouve pas seulement chez les rongeurs, mais, comme le prouve l'introduction de cette note, également dans des organes malades d'autres animaux ou dans d'autres substances encore, et il semble, en somme, assez répandu dans la nature.

Outre les pseudotuberculoses signalées jusqu'ici, nous ne manquerons pas de mentionner la pseudotuberculose bien étudiée par M. Courmont, différente certainement de la pseudotuberculose des rongeurs, car son agent producteur n'est pas le streptobacille. D'ailleurs, nous savons que M. Courmont a observé le streptobacille de M. Dor, et réciproquement; or, ces deux auteurs sont loin d'identifier les deux bacilles.

PSEUDOTUBERCULOSE DU MOUTON

Cela dit, nous passons à la description du bacille de notre pseudotuberculose, que nous n'avons faite dans notre première note que très superficiellement; je remarquais déjà alors, inci-

demment, que ce bacille trouvé par moi est différent des bacilles de la pseudotuberculose connus jusqu'à présent, ce qui sera prouvé dans la suite.

Isolement du bacille. — Les reins de mouton, qui ont servi de point de départ à nos recherches, servaient en même temps à des inoculations et à des ensemencements sur divers milieux. Ces derniers ne nous ont jamais donné qu'un bacille poussant très vite et abondamment, différent de celui qui existait dans les reins ; fait remarquable, ce bacille se retrouvait dans les lésions d'un cobaye inoculé dans la veine avec la matière originelle, et aussi dans les lésions d'un second cobaye inoculé avec les lésions du premier ; mais les nodules jeunes des animaux inoculés contenaient en grand nombre le petit bacille, trouvé originairement dans les reins de mouton ; si ce dernier bacille n'a pas apparu dans les cultures, c'est qu'il pousse ou très lentement, ou seulement dans une atmosphère privée d'oxygène ; l'expérience a vérifié la première supposition.

La rate remplie de pseudotubercules du deuxième cobaye fut écrasée, un demi-gramme de ce suc fut inoculé dans le péritoine d'un troisième cobaye, qui succomba le cinquième jour après. Avec les lésions du point d'inoculation, de l'épiploon, du ligament hépato-duodénal, j'ensemençai avec une aiguille de platine plusieurs tubes de gélose ; à 37° les tubes ensemencés avec les lésions de la paroi abdominale et de l'épiploon montraient toujours le grand bacille, poussant très vite, tandis que les tubes ensemencés avec les nodules du ligament hépato-duodénal ont donné un bacille tout différent, se développant très lentement.

Des lésions du troisième cobaye broyées avec de l'eau stérilisée, un gramme fut inoculé à un quatrième cobaye, et dix gouttes à un cinquième dans le péritoine. Dans le quatrième cobaye, on pouvait encore trouver le grand bacille, tandis que les lésions du cinquième ne contenaient plus que le petit, poussant beaucoup plus lentement. Il n'était donc plus douteux que c'était ce dernier bacille qui avait tué les animaux, parce qu'il était en tout conforme au bacille trouvé dans les reins du mouton, aussi bien que dans les lésions des animaux inoculés.

Inoculations. — Avec les cultures de ce bacille, on inocula

des lapins et des cobayes soit sous la peau, soit dans le péritoine; ces animaux devinrent malades et succombèrent tout comme les animaux inoculés avec les lésions originales.

Les animaux inoculés succombèrent 2-10-35 jours après l'inoculation. Dans les inoculations sous-cutanées il se formait un foyer nécrotique plus ou moins grand, qui fut parfois éliminé. Les résultats de l'inoculation sous-cutanée dans la cuisse et dans le péritoine étaient en général semblables, car dans l'un et dans l'autre cas il se formait des nodules purulents-caséeux, variant de la grosseur d'un grain de mil à celle d'un pois et davantage, dans les glandes lymphatiques, dans la rate, le foie et l'épiploon; il y avait pourtant une petite différence, car, dans l'inoculation sous-cutanée, c'étaient les glandes lymphatiques inguinales, et plus tard celles du bassin et du rétro-péritoine, qui étaient altérées en premier lieu, tandis que l'inoculation abdominale a provoqué ordinairement une péritonite générale avec des nodules surtout sur le feuillet pariétal du péritoine, et des foyers purulents-caséeux de l'épiploon toujours ratatiné, des ligaments hépatiques et gastriques, et des ganglions lymphatiques péri-portaux.

Un des cobayes inoculé sous la peau, et mort trente-cinq jours après, montra une rate très agrandie par des tumeurs confluentes de la grosseur d'un pois; les ganglions inguinaux étaient de la grosseur d'un haricot, et un ganglion du médiastin atteignait celle d'une noix.

Une souris blanche, inoculée dans le péritoine avec 1-2 gouttes de l'eau de condensation d'une culture sur gélose, est morte au bout de dix jours, et montra à l'autopsie des nodules tuberculiformes de la grosseur d'un grain de pavot jusqu'à celle d'un grain de mil sur le péritoine, dans la rate, le foie et les reins.

Pour le pigeon, les cultures n'étaient pas pathogènes, pas plus que la subtance prise dans les lésions pathologiques.

A une brebis j'inoculai dans la cuisse quelques grammes d'une culture en bouillon; au bout de quelques jours il se développait *in loco* une tumeur de la grosseur d'un œuf d'oie, qui éclata et qui élimina des lambeaux jaunâtres de tissu nécrosé; l'ulcération finissait par se cicatriser, tandis que les ganglions inguinaux s'accroissaient; mais l'animal vit encore et semble être sain une année après l'inoculation.

On réussit ordinairement, sans beaucoup de difficultés, à trouver notre bacille dans les lésions pathologiques, soit en écrasant un nodule sur la lamelle et en le colorant, soit en le colorant dans des coupes d'après Gram, soit par la culture sur les milieux nutritifs.

Cultures. — Si l'on prend un peu d'un nodule avec une aiguille de platine et qu'on l'étende bien à la surface de la gélose inclinée, on ne voit presque rien dans les tubes tenus à 37° 5 pendant 24 heures ; ce n'est que le lendemain qu'apparaissent de petites colonies, qui poussent très lentement et atteignent leur maximum six, huit jours après l'ensemencement ; alors leur diamètre est de 2 à 3 millimètres, au plus celui d'une lentille. Ces colonies ne sont pas d'un blanc pur, mais blanc-grisâtre, mates, minces, sous forme d'écaille ; leur forme est plus ou moins arrondie, à bords irréguliers, dentelés à la manière des lichens ; les colonies sont ou également minces, ou elles sont mamelonnées ; leur surface n'est pas lisse, mais chagrinée, sillonnée ou granuleuse. Un caractère notable de ces cultures est leur siccité, grâce à laquelle les colonies touchées avec l'aiguille se déplacent ou se brisent. Sur de la gélose glycérinée le bacille pousse moins vite.

La culture en piqûre dans la gélose montre à la surface une colonie semblable à celles qui se forment sur une surface inclinée ; la piqûre même est composée en haut par une strie assez épaisse, en bas par des points blancs isolés.

Dans la culture en bouillon, le bacille forme au fond de petites granulations, à la surface une croûte s'émiettant par l'agitation ; cette croûte est parfois assez épaisse, et elle ressemble aux écailles qu'on peut faire en laissant tomber de la stéarine fondue sur de l'eau fraîche ; le bouillon se trouble à peine.

Dans des cultures plus anciennes il est au contraire totalement clair, à sa surface la formation de la croûte a cessé, les débris de cette dernière et des granulations en occupent le fond. L'alcalinité du bouillon ne change pas dans les vieilles cultures.

Sur la gélatine à la température ordinaire, le bacille ne pousse pas en général ; dans l'étuve à 37° il pousse tout comme dans du bouillon.

Le milieu le plus favorable est le sérum du bœuf, sur lequel les colonies poussent plus vite et sont encoro plus caractéristiques que sur gélose, quoiqu'elles n'y deviennent jamais si étendues.

Sur du sérum faiblement coagulé (gélatinisé), la matière purulente caséeuse, ensemencée à 37°, donne déjà, au bout do vingt-quatre heures, naissance à des colonies petites, de la grosseur d'un point ou d'une graine de pavot; ces colonies s'agrandissent à peine, si bien que leur diamètre ordinairement ne surpasse pas 1,5 millimètre; elles ont aussi des bords irréguliers, mais une surface lisse et luisante, et, ce qui est le plus caractéristique, elles présentent une couleur jaune doré ou orangé; cette couleur se montre bien au fond de l'eau de condensation, où se forme un sédiment jaune assez copieux. Chose curieuse, la couleur jaune des colonies n'est pas toujours la même : tantôt elle est très foncée, tantôt elle est claire, malgré les conditions uniformes dans lesquelles ont végété les cultures; parfois même, les diverses colonies d'un seul tube présentent des nuances assez variées.

Outre la coloration jaune, les cultures sur le sérum sont encore caractérisées par une zone trouble assez large autour d'elles; cette zone est moins foncée au voisinage immédiat, elle est plus ou moins jaune, parfois plus jaune que la colonie même; ses contours sont effacés.

Sur du blanc d'œuf coagulé le bacille pousse incolore; sur la pomme de terre il ne végète pas en général.

Dans la goutte de bouillon suspendue, les bacilles forment des petits amas toujours sans mouvement et sans disposition à former des chaînettes.

En faisant avec une culture quelconque une préparation sèche, et en colorant avec une solution aqueuse de violet de gentiane ou de fuchsine, on peut bien étudier la morphologie de ce bacille, mais pas sans de très forts grossissements, puisque ce bacille est un des plus petits. Dans une telle préparation on aperçoit des formes presque entièrement sphériques à côté des bacilles plus ou moins longs aux bouts arrondis; les formes les plus caractéristiques sont les bacilles renflés. Le renflement peut être total ou partiel, c'est-à-dire à un bout, ou aux deux bouts du bacille, il en résulte des formes grosses ovoïdes et des formes en massues et en haltères. Par ce renflement les

bacilles peuvent atteindre une grosseur plusieurs fois plus grande que la normale. Dans un certain nombre des bacilles, surtout dans la partie moyenne des renflés, se font remarquer des stries transversales moins colorées, ce qui s'explique vraisemblablement par l'hétérogénéité et en conséquence par une coloration inégale du plasma.

Le bacille aime à former des amas épais.

Les formes sus-mentionnées se montrent dans les cultures sur gélose ainsi que sur sérum ou dans le bouillon ; seulement parfois les bacilles courts et minces sont les plus nombreux, l'autre fois au contraire ce sont les bacilles renflés ; ceux-ci sont les plus nombreux dans des cultures jeunes sur gélose, tandis que dans les cultures plus anciennes ils se colorent très difficilement et dépérissent en partie.

Dans des coupes, ce sont surtout les bacilles plus ou moins longs et les formes aux stries incolores qu'on voit, mais ils sont un peu plus minces que ceux des cultures, à peine plus épais que le bacille du rouget dans les tissus: des bacilles renflés n'y manquent pas non plus, mais le renflement n'est pas si considérable.

Au point de vue morphologique, ce bacille ressemble donc à celui de la diphthérie de l'homme (Löffler): seulement le dernier est plus gros dans tous ses diamètres.

Anatomie des lésions. — En ce qui concerne l'anatomie des altérations provoquées par notre bacille, je vais compléter ce qui était énuméré dans la première note, en remarquant que, pour l'uniformité, nous avons encore choisi pour nos recherches le foie du cobaye.

Le début de la formation du pseudotubercule est aussi une multiplication des cellules endothéliales qui, mélangées encore de globules blancs, obstruent la lumière des capillaires. Les cellules hépatiques subissent dès le début une dégénérescence, elles se gonflent, deviennent granuleuses, parfois elles renferment des vacuoles ; plus tard, quand les capillaires sont déjà obstrués, elles se séparent, s'atrophient, et enfin périssent sans doute, car dans des pseudotubercules plus âgés on n'en trouve que rarement ou pas du tout. A la périphérie du pseudotubercule, les cellules hépatiques sont souvent allongées dans une orientation concentrique. La plupart des nodules plus anciens

sont formés par des cellules irrégulières, à noyau bien colorable et à bordure étroite de plasma, qui peuvent être prises plutôt pour des cellules de granulation que pour des cellules épithélioïdes; parmi celles-ci, on ne trouve que peu de cellules de pus à noyau fragmenté. Des cellules à plusieurs noyaux n'ont pas pu être observées, ce qui n'a pas d'ailleurs d'importance.

L'arrangement des bacilles dans le tissu se présente très bien dans des coupes colorées avec la méthode de Gram, préalablement traitées avec du carmin. En général les bacilles sont rangés dans des masses épaisses de diverses grandeurs, entre lesquelles se trouvent à peine quelques individus isolés; mais parfois le tissu est totalement infiltré de bacilles. Les groupes de bacilles occupent ordinairement l'intérieur des cellules, dont ils ne dépassent pas les limites dans les nodules jeunes: mais dans les pseudotubercules plus anciens, leur étendue peut bien surpasser celle des cellules. Quelque grands que soient les amas bacillaires, toujours ils se colorent bien et uniformément.

Ce bacille, tout différent de tous les bacilles pathogènes connus jusqu'ici, engendre donc les mêmes altérations anatomiques que le streptobacille; inoculés aux animaux, tous deux provoquent une tumeur au point d'inoculation, dans les ganglions, et des nodules dans les organes divers; tous deux s'étendent avec prédilection dans les voies des vaisseaux lymphatiques, d'où ils peuvent arriver dans la circulation pour se localiser dans des organes éloignés, et pour y former des pseudotubercules; tous deux sont donc des parasites des tissus; l'un et l'autre ne se trouvent dans le sang qu'en petit nombre et pas dans tous les cas.

Il faut que je fasse remarquer une propriété de cette pseudotuberculose du mouton, qui est regardée par certains auteurs comme une caractéristique exclusive de la tuberculose, c'est la calcification. Chez les animaux d'expérience, je n'en ai jamais observé, sans doute à cause de la trop courte durée de la maladie, et il me faut aussi remarquer, que les foyers provoqués par l'inoculation étaient ordinairement tendres et renfermaient une substance caséeuse purulente.

Notre pseudotuberculose a provisoirement peu d'importance au point de vue de la pratique, et, pour la distinguer d'autres maladies semblables au point de vue anatomique, nous l'appelons

« pseudotuberculose du mouton » (*pseudotuberculosis ovis* de St. Etienne).

Il n'est pas impossible que la maladie tuberculiforme observée chez le bœuf dans plusieurs cas par le vétérinaire allemand, M. Walsthöni, dont un cas fut examiné et décrit par M. Kitt, soit causée par notre bacille. J'eus l'occasion d'examiner moi-même ces bacilles dans des coupes de poumons, et j'avoue que je les ai trouvés très semblables aux miens. Malheureusement M. Kitt n'a pas réussi à cultiver ces bacilles, et il est remarquable que les inoculations n'aient donné que des résultats négatifs.

Avant de terminer, nous ne pouvons pas manquer de remarquer que tous les cas de tuberculose, dans lesquels on n'a pas réussi à constater le bacille de Koch, doivent être regardés comme suspects de pseudotuberculose.

J'exprime ici ma reconnaissance à MM. Nocard, Pfeiffer, Parietti et Zagari pour m'avoir envoyé des cultures de leur bacille, et à M. Kitt pour m'avoir cédé du poumon ci-dessus mentionné.

Budapest, août 1893.

EXPLICATION DES FIGURES DE LA PLANCHE

Fig. I. — Streptobacille de la pseudotuberculose des rougeurs (provenant de M. Pfeiffer) culture sur la plaque de gélatine âgée de 3 jours : 1 : 1000

Fig. II. — Streptobacille de la pseudotuberculose dans une cellule de rate d'un cobaye inoculé avec une culture de M. Zagari; 1 : 1000.

Fig. III. — Bacille de la pseudotuberculose du mouton (de Saint-Etienne), culture sur gélose âgée de quelques jours ; 1 : 1000.

Fig. IV. — Bacille de la pseudotuberculose du mouton dans des cellules endothéliales du péritoine d'une souris inoculée dans l'abdomen ; 1 : 1000.

Fig. V. — Streptobacille de la pseudotuberculose en goutte suspendue ; chaînettes et bacilles renflés : 1 : 1000.

Fig. VI. — Bacille de la pseudotuberculose du mouton ; culture sur gélose âgée de trois mois ; 1 : 3.

Fig. VII. — Cellules à plusieurs noyaux d'un pseudotubercule jeune provoqué par le bacille de M. Parietti.

BIBLIOGRAPHIE

1. L. Malassez et W. Vignal, Tuberculose zoogléique. (*Arch. de phys. norm. et path.*, 1883, II.)

2. L. Malassez et W. Vignal, Sur le microorganisme de la tuberculose oo gléique. (*Ibidem*, 1884.)

3. C. J. Eberth, Zwei Mykosen des Meerschweinchens. (*Virchow's Arch. T. C.*)
4. C. J. Eberth, Der Bacillus der Pseudotuberculose d. Kaninchens (*Virchows Arch.* T. CIII.)
5. A. Chantemesse, La tuberculose zoogléique. (*Annales de l'Institut Pasteur*, 1887.)
6. E. Nocard, Sur une tuberculose zoogléique des oiseaux de basse-cour. (*Recueil de médecine vétérinaire*. 1885, mai.)
7. Nocard et Masselin, Sur un cas de tuberculose zoogléique d'origine bovine. (*Société biologique*. 1889, mars.)
8. Nocard, sur la tuberculose zoogléique. (*Ibidem* : octobre.)
9. Charrin et Roger, Première note sur une pseudotubercul. bacillaire. (*Mémoires de la Société de biolog.* 1888.)
10. Charrin et Roger, Sur une pseudotub. bacillaire (C. R. *de l'Acad. des sciences*, 1888.)
11. Dor, De la tuberculose streptobacillaire du lapin et du cobaye. (*Mém. de la Soc. de biologie*. 1888.)
12. Grancher et Ledoux-Lebard, Recherches sur la tubercul. zoogléique. (*Arch. de méd. expérim.* 1889, 1890.)
13. Courmont, Sur une nouvelle tuberculose bacillaire. (*Société de biologie*, 1889.)
14. A. Pfeiffer, *Ueber die bacillare Pseudotuberculose bei Nagethieren*. Leipzig, 1889.)
15. Zagari, Sulla cosi detta tuberculosa zoogleica. (*Centralblatt f. Bakteriologie*. 1890.)
16. Parietti, Eine form von Pseudotuberculose. (*Ib.* 1890.)
17. Baumgarten. (*Lehrbuch d. pathol. Mykologie*. 1890.)
18. Du Cazal et Vaillard, Sur une maladie parasitaire de l'homme. (*Annales de l'Institut Pasteur*. 1893.)
19. Hayem, Pseudotuberculose bacillaire chez l'homme. (*La semaine méd.* 1891 jul.)
20. Manfredi, Ueber einen neuen Mikrococcus als pathog. Agens bei infect. Tumoren. (*Fortschritte der Medicin*. 1886.)
21. Disse et Taguchi. (*Baumgartens Jahresbericht*, 1885-86.)
22. Toussaint. (*Comptes rendus et Revue vétérinaire* 1880-81.)
23. Kitt, Zur Kenntniss tuberculoseähnlicher Zustände der Lunge des Rindes (*Monatshefte fur prakt. Thierheilkunde*. 1890.)
24. Cornil et Babes, *Les bactéries*, Paris. 1890, t. II.

INSTITUT PASTEUR

Personne morte après traitement, d'une affection indéterminée

Robert, Joseph, 8 ans, de Bougie département de Constantine, mordu le 4 octobre 1893; traité à l'Institut Pasteur du 10 au 28 octobre.

Les morsures au nombre de 10 étaient situées sur la main et l'avant-bras droit et sur la cuisse gauche; elles avaient été cautérisées à l'ammoniaque 5 heures après l'accident.

Le chien mordeur, examiné par M. Senac-Pagès, vétérinaire à Bougie, avait été reconnu enragé.

Le jeune Robert a succombé le 16 février 1894, au cours d'accidents nerveux que le docteur Perrusset, de Bougie, ne croit pas devoir rapporter à la rage. La maladie en effet n'a duré que 6 heures.

INSTITUT PASTEUR

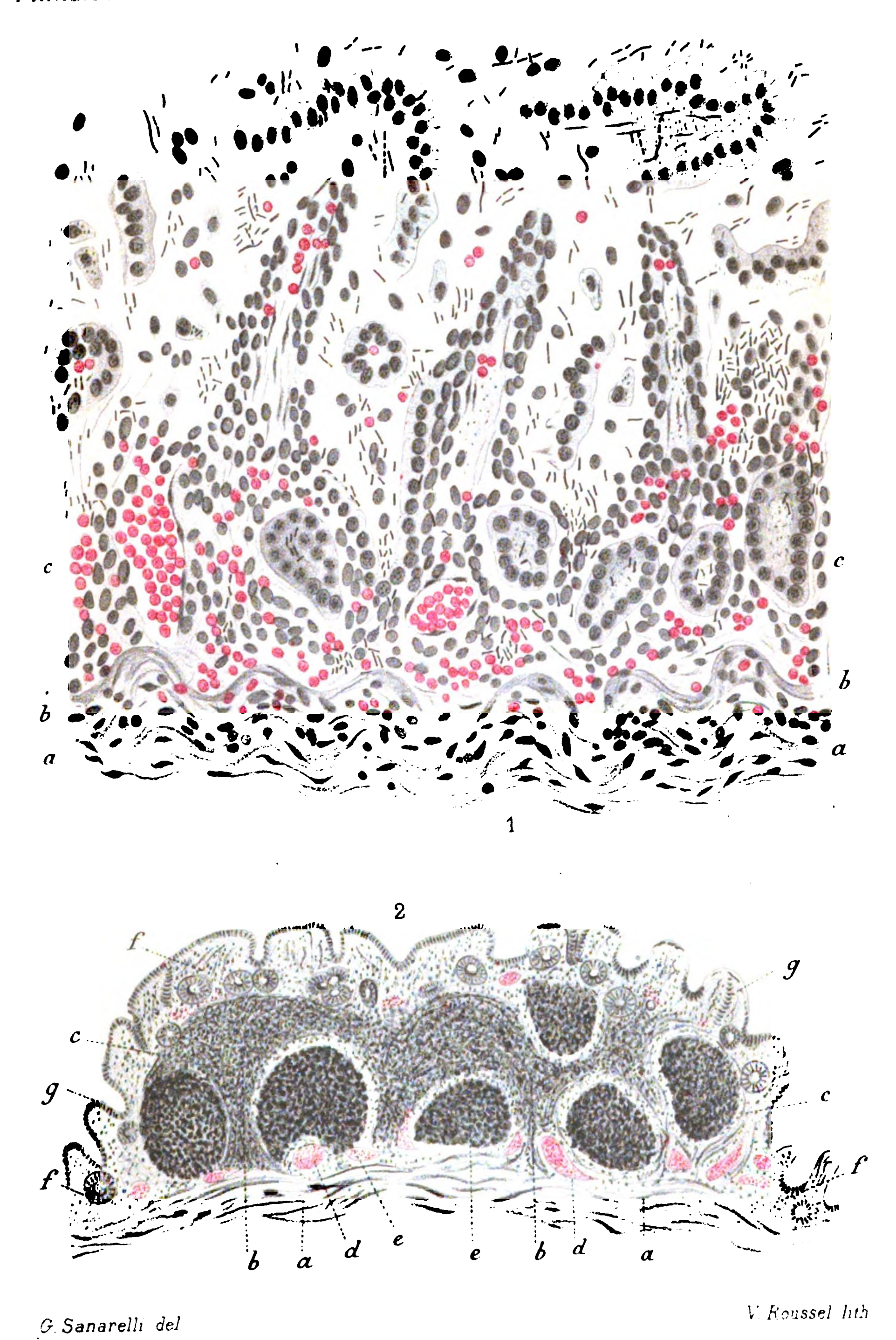
STATISTIQUE[1] DU TRAITEMENT PRÉVENTIF DE LA RAGE. — FÉVRIER-MARS 1894.

	A			B			C		
Morsures à la tête et à la figure — simples	»	2	2	»	8	13	»	»	1
Morsures à la tête et à la figure — multiples	»	»		»	5		»	1	
Cautérisations efficaces	»	»	»	»	»	»	»	»	»
— *inefficaces*	1	»	»	2	»	»	1	»	»
Pas de cautérisation	1	»	»	11	»	»	»	»	»
Morsures aux mains — simples	»	5	12	»	48	80	»	14	2[illegible]
Morsures aux mains — multiples	»	7		»	32		»	17	
Cautérisations efficaces	»	»	»	2	»	»	»	»	»
— *inefficaces*	6	»	»	26	»	»	16	»	»
Pas de cautérisation	6	»	»	32	»	»	13	»	»
Morsures aux membres et au tronc — simples	»	5	9	»	13	34	»	12	35
Morsures aux membres et au tronc — multiples	»	4		»	21		»	23	
Cautérisations efficaces	»	»	»	»	»	»	»	»	»
— *inefficaces*	8	»	»	20	»	»	19	»	»
Pas de cautérisation	1	»	»	14	»	»	16	»	»
Habits déchirés	3	»	»	26	»	»	34	»	»
Morsures à nu	6	»	»	8	»	»	1	»	»
Morsures multiples en divers points du corps	»	1	1	»	1	1	»	»	»
Cautérisations efficaces	»	»	»	»	»	»	»	»	»
— *inefficaces*	»	1	»	»	»	»	»	»	»
Pas de cautérisation	»	»	»	1	»	»	»	»	»
Habits déchirés	»	»	»	»	»	»	»	»	»
Morsures à nu	»	1	»	1	»	»	»	»	»
Totaux. — Français et Algériens		24	24		114	128		60	65
Totaux. — Etrangers		»			14			5	
		A			B			C	
TOTAL GÉNÉRAL					217				

1. Les animaux mordeurs ont été : chats, 6 fois; cheval, 1 fois; mulets, 1 fois; chiens, 209 fois.

Le Gérant : G. MASSON.

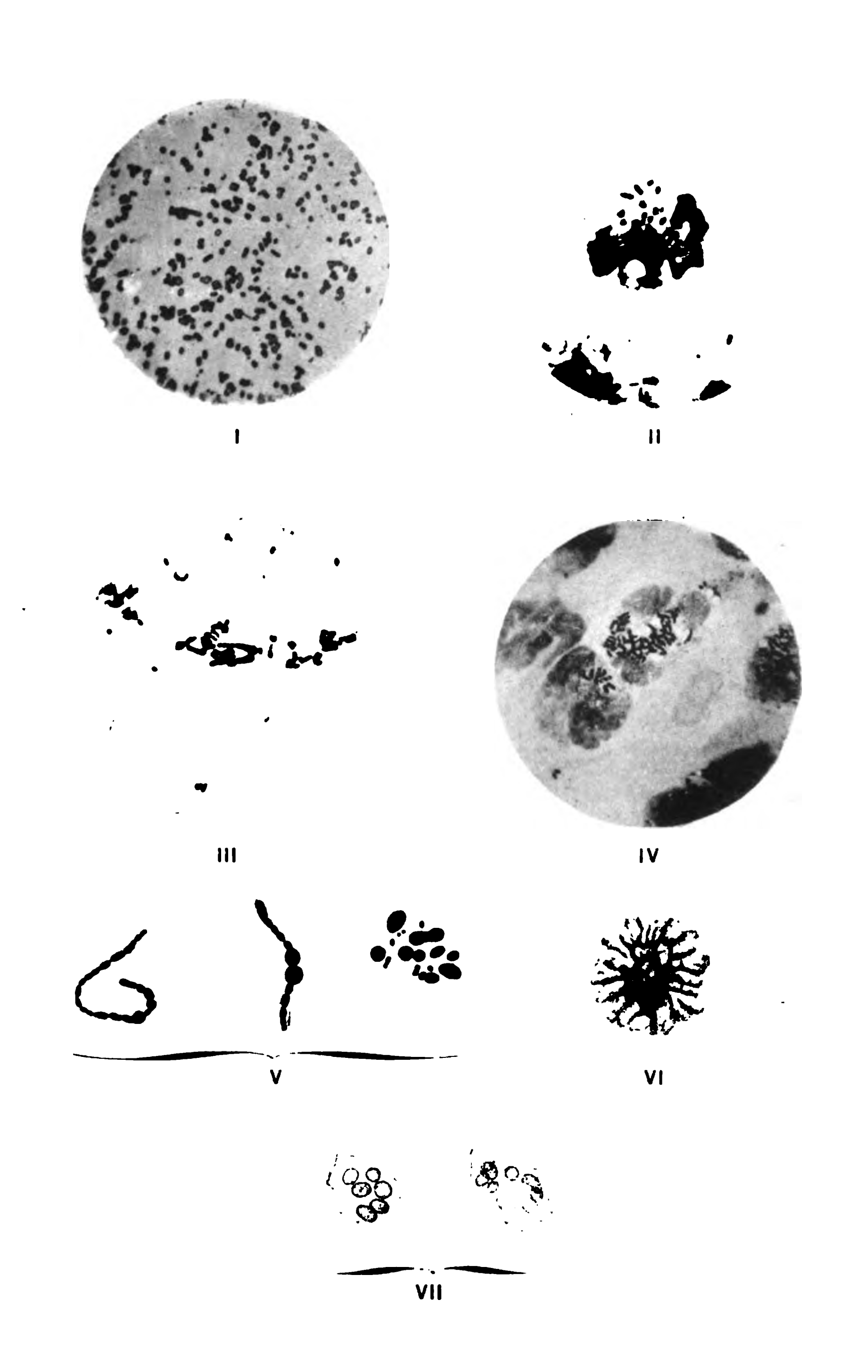
Sceaux. — Imprimerie Charaire et Cie.



G. Sanarelli del

V. Roussel lith

Imp. A. Lafontaine & Fils, Paris.



Preisz, phot. et del. Phototypie Jourdan, Grenoble.

8me ANNÉE MAI 1894. N° 5.

ANNALES

DE

L'INSTITUT PASTEUR

RECHERCHES SUR LE CHOLÉRA ET LES VIBRIONS

PAR EL. METCHNIKOFF

TROISIÈME MÉMOIRE

SUR LA VARIATION ARTIFICIELLE DU VIBRION CHOLÉRIQUE

AVEC LA PLANCHE X

I

APERÇU DES TRAVAUX RÉCENTS SUR LE MICROBE DU CHOLÉRA

Dans mes deux premiers mémoires (ces *Annales*, 1893, n°s 5 et 7), j'ai surtout tâché d'établir les propositions suivantes : 1° le vibrion de Koch est l'agent producteur du choléra asiatique ; 2° l'immunité et la guérison dans cette maladie ne peuvent nullement être attribuées à la propriété préventive du sang ; 3° l'immunité des animaux contre la péritonite expérimentale, provoquée par le vibrion cholérique, est due surtout à la fonction phagocytaire des cellules ; 4° ce vibrion ressemble à tel point à plusieurs de ses congénères que son diagnostic se heurte à de très grandes difficultés.

Avant d'aborder le sujet spécial de notre mémoire actuel, il faut s'arrêter sur certaines publications récentes se rattachant aux points que nous venons de mentionner.

Bien peu nombreuses ont été les voix des adversaires du rôle étiologique du vibrion de Koch. La plupart ont dû reconnaître que ce microbe doit être considéré comme le véritable producteur du choléra asiatique. Cependant M. Drasche, qui déjà depuis longtemps s'est élevé contre la valeur étiologique du vibrion, vient de publier une série d'articles [1] consacrés

1. *Wiener medic. Wochenschrift*, 1894.

à un réquisitoire sévère contre la doctrine de Koch. Il y réunit toute sorte d'arguments contre cette théorie du bacille virgule, et arrive à conclure que l'effet pathogène du vibrion de Koch ne ressemble nullement au choléra et que d'autres bactéries peuvent engendrer chez l'homme exactement les mêmes symptômes. M. Drasche s'appuie surtout sur quelques expériences avec un streptocoque, isolé des selles d'un malade de choléra *nostras*. Avalé par plusieurs individus, ce microbe a provoqué une diarrhée semblable à celle qui a été observée dans plusieurs expériences avec le vibrion cholérique.

Pour soutenir sa thèse, M. Drasche a dû faire la critique de l'expérience sur l'homme, relatée dans mon second mémoire, expérience qui a abouti à un accès de choléra asiatique véritable. M. Drasche conteste ce fait. Il me reproche le manque de détails cliniques et s'étonne de ce que, dans le cas en question, les selles riziformes s'étaient brusquement transformées en déjections moulées, ce qu'on n'observe jamais dans le vrai choléra. M. Drasche a raison en cela, mais il se trompe fortement dans l'exposé des faits. Jamais il n'a été dit dans mon mémoire que cette transformation se fût accomplie. En réalité, dans ce cas de choléra expérimental, les selles riziformes se sont maintenues pendant deux jours et ont cédé la place à une diarrhée très liquide mais colorée. Ce n'est que le onzième jour de la maladie qu'apparut la première déjection moulée.

La description de la maladie que j'ai donnée dans mon mémoire, ainsi que les notes supplémentaires de cette page des *Annales* (1893), suffisent pleinement pour prouver qu'il s'agissait incontestablement d'un cas de vrai choléra. Aussi les cliniciens très expérimentés qui l'ont observé n'ont pas eu le moindre scrupule pour poser le diagnostic.

Les doutes qui ont été exprimés par M. Drasche et par quelques autres critiques ne peuvent donc persister, de sorte que le fait, que le vibrion de Koch est l'agent producteur du choléra, reste définitivement établi.

Comme d'un côté il a été impossible d'obtenir, avec le vibrion de Koch, chez des animaux, une affection intestinale semblable au choléra [1], et comme, d'un autre côté, les expériences sur

1. Je décrirai prochainement un moyen d'obtenir le vrai choléra intestinal chez les animaux.

l'homme peuvent être très dangereuses, les savants ont cherché une méthode facile pour juger de l'état réfractaire de l'organisme vis-à-vis du choléra. On a pensé, et c'est surtout M. G. Klemperer qui a fait des recherches nombreuses dans cette voie, que la propriété du sang humain de prévenir la péritonite des animaux, provoquée par l'injection des vibrions cholériques, pouvait fournir une mesure facile et exacte de l'immunité de l'homme contre le choléra. Des expériences variées, que j'ai résumées dans mon premier mémoire, m'ont appris que cette méthode n'était pas sûre. Le sang des individus qui guérissent de cette maladie peut ne pas être préventif, tandis que le sang des personnes qui meurent du choléra peut, comme cela a déjà été démontré par M. Botkine, préserver les cobayes de la péritonite vibrionnienne. Dans les cas où ce pouvoir préventif était manifeste, la quantité de sérum nécessaire pour obtenir un effet était tellement variable qu'il était impossible de l'employer comme mesure de l'état réfractaire. Je me suis donc prononcé en principe contre l'application de cette méthode dans les recherches sur la vaccination.

Depuis ma publication, cette propriété préventive a été étudiée par plusieurs savants tels que M. Lazarrus [1], R. Pfeiffer[2], mais surtout par M. Issaeff [3], dans un travail exécuté à l'Institut du professeur Koch à Berlin. Les résultats de toutes ces observations concordent parfaitement avec les déductions que j'avais formulées dans mes deux premiers mémoires. Ainsi M. Issaeff s'est assuré que le sérum sanguin, retiré six et huit jours après le début de la guérison de deux individus atteints de choléra grave, ne manifestait aucun pouvoir préventif. La guérison, comme dans les cas que j'avais cités dans mon premier mémoire, ne peut donc nullement être expliquée par la propriété préventive du sérum.

D'un autre côté, M. Pfeiffer (*l. c.*, p. 284) signale le fait que « les cobayes, à l'époque où leur sang a déjà perdu sa propriété préventive, sont néanmoins encore réfractaires contre le virus cholérique ». Il en conclut, conformément à mes affirmations antérieures, « qu'il est inexact d'identifier l'immunité avec un changement spécifique du sang ».

1. *Berl. klin. Wochenschr.*, 1893, n° 51.
2. *Zeitschr. f. Hygiene*, 1894. Vol. XVI, p. 283.
3. *Ibid.*, p. 308.

Mais, d'après MM. R. Pfeiffer et Issaeff, la propriété préventive du sang, à un degré supérieur à celui que possède le sang des individus normaux, est toujours très manifeste pendant la période comprise entre la quatrième et la septième semaine après le début de la maladie. Plus tard elle baisse pour disparaître au bout de trois mois après les premiers signes de la maladie. Cette règle confirme bien la thèse que la propriété préventive du sang ne saurait être considérée comme cause de la cessation du processus cholérique. Si l'on examine un grand nombre de cas, on voit bien que les limites tracées par MM. Pfeiffer et Issaeff sont loin d'être toujours applicables. Ainsi, le sang d'un malade du service de M. le professeur Netter (ce cas est mentionné sous le n° 24 de l'appendice IV de mon premier mémoire), injecté en quantité de 0,25, 0,75, 1 et 1,5 c. c. dans le péritoine de quatre cobayes moyens, ne les a pas empêchés de mourir de péritonite cholérique. Ce sang a été retiré 22 jours après le début de la maladie. En même temps, 0,25 et 0,50 c. c. de sang défibriné d'une femme morte le dixième jour après le début du choléra, ont préservé deux cobayes inoculés avec les mêmes doses de la même culture vibrionienne qui a servi pour la première expérience.

D'un autre côté, je puis citer le cas d'une dame (n° 10 de l'appendice IV de mon premier mémoire) dont le sang fut retiré huit semaines après le début du choléra, c'est-à-dire à une époque encore éloignée des trois mois désignés comme terme de la disparition de la propriété préventive. De sept cobayes qui reçurent dans le péritoine 0,06; 0,12; 0,5; 0,5; 0,75; 1 et 1,5 c. c., le dernier seulement a été préservé contre une dose de vibrions cholériques à laquelle ont résisté, dans la même expérience, deux cobayes qui reçurent 1 et 2 c. c. de sérum sanguin de cobaye normal.

Plus on multiplie les expériences sur la propriété préventive dans le choléra, plus on se persuade de l'impossibilité d'établir des règles bien stables. Des recherches récentes, dont les résultats doivent entrer dans un de mes prochains mémoires, m'ont confirmé dans cette opinion. Mais si je persiste à la maintenir, cela ne tient nullement à ce que je considère ce pouvoir préventif comme quelque chose d'« accidentel », comme me le fait dire à tort et à plusieurs reprises M. Issaeff dans son mémoire

(*l. c.*, pp. 288, 315). La propriété préventive n'est point du tout accidentelle, mais elle est un phénomène très complexe, dont les lois ne peuvent nullement être renfermées dans les limites étroites formulées par MM. Pfeiffer et Issaeff.

L'étude de ce pouvoir préventif, entreprise par plusieurs observateurs, a donné des résultats très intéressants au point de vue de la conception générale de l'immunité des animaux contre la péritonite cholérique.

MM. C. Fränkel et Sobernheim[1] ont observé la transmissibilité de la propriété préventive du sérum sanguin par injections consécutives de cette humeur. Ainsi, un cobaye qui a reçu 2 c. c. de sérum préventif fournit lui-même un sérum préventif, sans être préalablement éprouvé avec des vibrions. La même quantité de sérum (2 c. c.) suffit pour immuniser un cobaye de la troisième génération. Cette propriété se transmet pendant quelque temps, mais finit bientôt par s'épuiser. De ces expériences, leurs auteurs concluent que le sérum exerce son action préventive en stimulant la résistance des éléments cellulaires de l'organisme.

MM. Fränkel et Sobernheim établissent ensuite que la propriété préventive du sérum ne peut être attribuée à son pouvoir bactéricide, parce que, chauffé à 70°, le sérum perd ce dernier, conservant en même temps son pouvoir préventif. Bien plus, ce sérum chauffé amène chez le cobaye non seulement l'établissement de la propriété préventive, mais aussi celui du pouvoir bactéricide, qui doit être considéré par conséquent comme une manifestation spéciale de l'activité cellulaire.

D'après ces observations, l'immunité pour la péritonite cholérique des animaux réside, non dans un pouvoir antitoxique des humeurs, mais bien dans une stimulation des propriétés bactéricides de l'organisme. MM. Fränkel et Sobernheim ne s'expriment pas d'une façon bien nette sur la localisation de ces propriétés, mais du fait que M. Sobernheim a insisté dans un travail antérieur[2] sur la propriété bactéricide du sérum sanguin, on pourrait conclure que, dans cette conception de l'immunité, il s'agit du pouvoir bactéricide des humeurs et non des cellules.

Tel n'est pas l'avis de MM. R. Pfeiffer et Issaeff. Ce dernier

1. *Hygienische Rundschau*, 1894, n°s 3 et 4.
2. *Zeitschr. f. Hygiene*. Vol. XIV, p. 505.

considère comme hors de doute que la propriété bactéricide du sang ne joue pas un rôle important dans l'immunité contre le choléra (*l. c.*, p. 317). Il cite à l'appui le fait que les cobayes, au moment de la plus forte immunité contre le choléra, c'est-à-dire vingt-quatre heures après l'injection des vibrions dans le péritoine, ne manifestent aucune propriété bactéricide spécifique de leur sang. « Dans le sérum d'un tel sang, le vibrion pousse aussi bien que dans le sérum sanguin des cobayes normaux. »

L'organisme, privé de la propriété bactéricide du sang et ne présentant aucun pouvoir antitoxique, est néanmoins très résistant, et cela grâce à l'action phagocytaire des leucocytes.

M. Issaeff a fait une étude très intéressante sur le rôle de ces éléments dans l'immunité naturelle et acquise des cobayes vis-à-vis du vibrion cholérique. Il a constaté que toute une série de substances, telles que la solution physiologique de chlorure de sodium, le bouillon, la nucléine, la tuberculine, l'urine et le sérum des hommes normaux, préservent les cobayes contre l'infection vibrionienne, si cette infection se fait au moment de la plus forte leucocytose provoquée par ces différents liquides. Ainsi, le bouillon, qui est un excellent milieu de culture pour le vibrion cholérique, exerce néanmoins une action immunisante, et ceci grâce à sa propriété d'exciter les leucocytes. Le pouvoir bactéricide principal, celui qui joue le plus grand rôle dans la résistance de l'organisme, réside donc dans les phagocytes.

M. R. Pfeiffer, qui a été témoin de ces expériences, confirme les faits observés par M. Issaeff et accepte « le rôle important des phénomènes phagocytaires dans la résistance » ; mais il fait la restriction suivante : « On ne doit pas confondre — dit-il à la page 282 de son mémoire — cette résistance passagère due à la phagocytose avec la vraie immunité contre le choléra, qui s'accomplit facilement chez les cobayes à l'aide de vaccinations avec des vibrions vivants ou avec les produits de leurs cultures. La vraie immunité contre le choléra n'est point passagère, mais bien durable. » Il paraît que M. Issaeff partage cette manière de voir, comme on peut en juger d'après le paragraphe 6 de ses conclusions (*l. c.*, p. 327). Et cependant, ni M. R. Pfeiffer ni M. Issaeff n'ont fourni aucune preuve de l'importance de leur distinction. Dans les deux catégories de phénomènes (traitement préventif par le bouillon, sérum, etc., d'un côté, et la vaccination

avec les vibrions de l'autre), on observe des phénomènes de leucocytose et de phagocytose tout à fait analogues. Seulement, dans la seconde catégorie, les phénomènes phagocytaires sont plus prononcés. Cette différence s'explique par la stimulation des leucocytes, plus forte avec des produits vibrioniens qu'avec d'autres liquides. D'un autre côté, elle explique la durée plus grande de l'activité phagocytaire à la suite de la vaccination avec des produits vibrioniens. S'il fallait admettre des distinctions essentielles selon la durée de l'état réfractaire, il faudrait accepter des causes différentes pour l'immunité acquise contre le charbon, qui dure une série de mois, et pour l'immunité acquise des animaux contre le pneumocoque, qui ne dure que quelques semaines. Quoique M. Issaeff ajoute que, dans l'immunité des cobayes contre la péritonite cholérique, d'autres facteurs que les phagocytes « contribuent sans aucun doute à la résistance », cependant ses propres recherches ne fournissent aucune preuve en faveur de cette assertion. Il nie l'importance de la propriété bactéricide des humeurs tout aussi bien que celle du pouvoir atténuant et antitoxique du liquide sanguin. On ne se figure même pas quels peuvent être ces facteurs, dont le concours est cependant considéré comme étant hors de doute,

Les belles recherches de M. Issaeff doivent donc être considérées comme un nouvel appui de la théorie des phagocytes. L'application de celle-ci à la péritonite cholérique des cobayes a été assurée par la démonstration que l'exsudat des animaux vaccinés, retiré de l'organisme, fournit une abondante culture de vibrions qui se développent dans l'intérieur des leucocytes morts et envahissent le liquide de l'exsudat. (Voir mon premier mémoire sur le choléra.)

MM. Pfeiffer et Issaeff[1] se sont servi de la vaccination des cobayes contre la péritonite vibrionienne, comme méthode pour différencier le bacille virgule d'autres vibrions analogues.

On sait que plus on a approfondi cette question des caractères spécifiques du vibrion cholérique, plus elle est devenue difficile et embrouillée. Tandis qu'à l'époque de la découverte de Koch, la distinction du vibrion cholérique semblait chose facile et simple, plus tard, avec le perfectionnement des méthodes, la grande analogie de ce microbe avec beaucoup

1. *Deutsche medic. Wochenschr.*, 1894, n° 13.

d'autres vibrions a amené toutes sortes de complications. M. Koch a tenté de résoudre la question en introduisant la virulence déterminée et la réaction indolnitreuse comme caractères suffisants pour distinguer le vibrion cholérique. Mais l'année qui s'est écoulée depuis la publication de M. Koch a apporté toute une série de découvertes qui ont prouvé l'inefficacité des caractères différentiels établis par le grand bactériologiste. C'est pour parer à cet inconvénient que MM. Pfeiffer et Issaeff ont entrepris leurs recherches minutieuses, au sujet desquelles ils n'ont publié qu'une note préliminaire.

D'après ces observateurs, le caractère le plus marqué pour distinguer le vibrion cholérique est fourni par la propriété préventive du sérum des animaux vaccinés. Si le sérum, retiré à un animal vacciné contre le bacille virgule, préserve un cobaye neuf contre le vibrion mis à l'étude, celui-ci appartient sûrement à l'espèce cholérique. Dans le cas contraire, le vibrion en question doit être considéré comme non cholérique. D'un autre côté, l'immunité donnée par le vibrion cholérique se maintient vis-à-vis de cette même espèce pendant trois mois et se perd pour les espèces différentes en 10 à 15 jours. Si donc un animal, vacciné trois mois auparavant par le vibrion cholérique ou ses produits, résiste à l'injection d'un vibrion, celui-ci est le vibrion du choléra; si l'animal meurt, le vibrion en question doit être exclus de l'espèce cholérigène.

A l'aide de cette méthode, MM. Pfeiffer et Issaeff arrivent à la conclusion suivante : plusieurs vibrions, isolés des déjections cholériques, doivent être considérés, malgré leur grande ressemblance avec le vibrion de Koch, comme n'appartenant pas à cette espèce. Ils excluent ainsi de l'espèce cholérigène un vibrion qui a été isolé par M. Weichselbaum d'un cas de choléra, et un autre qui a été envoyé à M. R. Pfeiffer par l'Institut Pasteur à Paris.

Comme ce dernier vibrion n'est autre que celui qui a été isolé d'un cas de choléra asiatique, à Massaouah, par M. Pasquale, et comme il est le même qui a été désigné comme vibrion cholérique par M. R. Pfeiffer dans ses recherches sur le choléra en 1892 (*Zeitschr. f. Hyg.*, t. XI) on voit bien à quels résultats paradoxaux nous amène la méthode nouvelle de l'Institut de Berlin.

Jusqu'à ces derniers temps on se consolait avec cette idée que la difficulté du diagnostic du vibrion cholérique ne se présentait

que dans la recherche des vibrions des eaux. C'est ainsi que M. Gruber, dans un article qu'il vient de publier[1], insiste sur la facilité de distinguer le vibrion cholérique dans les cas de choléra. Il signale cependant, dans une note ajoutée pendant l'impression, que la trouvaille de M. Ivanoff[2], faite à l'Institut de M. Koch, complique singulièrement la question. Il s'agit d'un cas de fièvre typhoïde typique, pendant laquelle les déjections liquides étaient remplies d'un vibrion tout à fait semblable à celui de Koch. Les quelques différences secondaires, comme la longueur des vibrions et les contours plus irréguliers des colonies sur plaque de gélatine, ont suffi pour permettre de se prononcer nettement contre l'identité du vibrion d'Ivanoff avec le vibrion cholérique. Mais ici il s'agissait d'une maladie bien distincte du choléra au point de vue clinique, tandis que dans les cas de Massaouah et de M. Weichselbaum, les vibrions, considérés comme différents du bacille virgule, ont été découverts dans des selles de malades atteints du vrai choléra.

On conçoit donc la difficulté qui se présente pour le diagnostic bactériologique de cette maladie. M. Gruber, qui a fait une étude très minutieuse de cette question délicate, arrive à cette conclusion, que le seul caractère vraiment différentiel du vibrion cholérique est présenté par l'aspect des toutes jeunes colonies sur des plaques de gélatine à 10 °/₀. Ces colonies doivent toujours avoir des contours irréguliers et présenter une surface couverte de granulations grossières. En dehors du vibrion cholérique, il n'y a que le vibrion de Deneke qui présente, d'après M. Gruber, les mêmes propriétés que les jeunes cultures du choléra. Or, c'est justement la forme nettement arrondie des colonies toutes jeunes du microbe de Deneke, qui a été, dès le commencement, invoquée comme un des caractères distinctifs entre ce vibrion et le vibrion cholérique. En réalité, il y a des vibrions de Deneke avec des colonies très jeunes et toutes rondes, et d'autres vibrions de Deneke qui se distinguent par l'irrégularité de leurs contours. Chez le vibrion cholérique, il y a des races qui se distinguent par des contours tellement ronds des jeunes colonies, et par une telle absence de granulations qu'on a souvent beaucoup de peine pour les diagnostiquer.

1. *Archiv für Hygiene*, XX, 1894, p. 123.
2. *Zeitschr. f. Hyg.*, t. XV, p. 432.

M. Gruber sent tellement bien toutes les difficultés qu'il déclare (*l. c.*, p. 151) suspectes toutes les indications de ce microbe dans les eaux.

M. Dunbar[1], dans une étude très intéressante sur les vibrions des eaux, arrive à la même conclusion et termine son mémoire en disant qu'il « est encore impossible de donner un jugement définitif sur l'identité supposée de nos vibrions cholériformes des eaux avec les vrais vibrions cholériques ».

Ce court aperçu nous montre jusqu'à quel point ce chapitre sur le diagnostic bactériologique du choléra est encore incertain. Voilà pourquoi nous jugeons indispensable de consacrer une étude spéciale à l'examen des caractères morphologiques et des variations du vibrion cholérique.

II

SUR LES VARIÉTÉS ARTIFICIELLES DU VIBRION CHOLÉRIQUE

On sait que M. Cunningham a voulu démontrer l'inexactitude de la théorie du bacille virgule, en admettant qu'il existait chez des cholériques au moins une dizaine d'espèces vibrioniennes, presque toutes liquéfiant plus ou moins la gélatine. Or, le choléra asiatique étant une unité morbide incontestable, il est impossible d'admettre qu'elle soit due à plusieurs espèces microbiennes.

Dans le but de se faire un jugement sur ces distinctions, M. Friedrich[2], à Berlin, a soumis les vibrions de M. Cunningham, ainsi qu'un grand nombre d'autres vibrions cholériques, à une étude comparative détaillée. Il est arrivé à cette conclusion que les prétendues espèces de M. Cunningham ne représentent, dans la grande majorité des cas, que de simples variations de forme du bacille virgule, tel qu'il avait été découvert et décrit par M. Koch. M. Friedrich admet que le vibrion cholérique subit, au bout d'une longue période de croissance sur des milieux artificiels, des anomalies de forme. « Mais, — ajoute-t-il, — il ne se produit jamais de changements constants du germe

1. *Arb. a. d. k. Gesundheitsamte*, 1894. Vol. IX, p. 379.
2. *Arbeiten a. d. K. Gesundheitsamte*. Vol. VII, 1892, p. 87.

cholérique; par contre, ces variations de forme subissent souvent des oscillations impossibles à contrôler, et il arrive que ces formes anormales redeviennent de nouveau typiques. On n'a donc aucun droit de parler ni de vraies « variations », ni de phénomènes « d'adaptation des formes » (*l. c.*, p. 132).

Lorsqu'on examine des cultures de vibrions provenant des cholériques ou isolés de différentes eaux, on y trouve deux types assez distincts : d'abord des vibrions courts et recourbés, se rattachant au type du bacille virgule décrit par Koch, et ensuite des filaments longs et minces, tantôt presque droits, tantôt enroulés en spirales à plusieurs tours. Dans son mémoire sur les vibrions des eaux (ces *Annales*, 1893), M. Sanarelli a signalé plusieurs races rentrant dans ces deux types. Le vibrion cholérique d'Angers et les vibrions aquatiques de Saint-Cloud et de Gennevilliers rentrent dans la première, le vibrion cholérique de Courbevoie et le vibrion aquatique de Versailles rentrent dans la seconde catégorie. Parmi les vibrions isolés des déjections cholériques, la plupart se rattachent au type original de Koch; mais le vibrion de Paris de 1889, celui de Courbevoie et de Massaouah se distinguent par la finesse et la longueur des filaments. On peut d'autant moins mettre en doute la nature cholérigène de ces longs vibrions, que c'est justement avec l'un d'eux (choléra de Paris, 1884) qu'a été obtenu le cas de choléra expérimental, mentionné plus haut. Le passage par l'organisme humain n'a nullement changé la forme allongée typique du vibrion de 1884; le vibrion de Courbevoie est aussi resté mince et allongé, malgré le passage par l'intestin de l'homme, dans une expérience relatée dans mon second mémoire.

Voilà pourquoi je ne peux attacher d'importance, comme caractère distinctif, à la longueur du vibrion d'Ivanoff[1], isolé dans un cas de fièvre typhoïde. Ce vibrion se rattache exactement au type allongé du choléra (Courbevoie, Paris, 1884, etc.), de sorte que, sous ce rapport, on n'a aucun droit de le considérer comme une espèce différente.

Les deux types de vibrions que je viens de signaler présentent une assez grande constance et se conservent, non seulement après le passage à travers l'homme, mais gardent leurs particularités aussi sur toute sorte de milieux nutritifs. On a

1. *Zeitschr. f. Hygiene.* Vol. XV, 1893, p. 434.

essayé plusieurs fois d'établir au moins deux espèces de vibrion cholérique, et on pourrait tenter d'élever les vibrions allongés et les virgules courtes au rang d'espèces distinctes, en se basant sur les faits que je viens de citer. Et, cependant, une telle conclusion ne correspondrait point à la réalité.

Les vibrions courts et allongés ne présentent pas deux types constants, mais constituent simplement deux races qui peuvent se transformer l'une dans l'autre, selon les circonstances extérieures. Le moyen le plus facile pour transformer les vibrions du type allongé et mince en une forme courte et recourbée, c'est de les faire passer par les corps des leucocytes. Les vibrions cholériques filamenteux de Courbevoie ou de Massaouah deviennent trapus et raccourcis, si on les inocule à des cobayes vaccinés, et si on fait des cultures sur gélose avec l'exsudat de ces animaux. Le passage à travers le tube digestif des cobayes (non soumis au traitement par la méthode de Koch) sert aussi pour transformer le vibrion de Massaouah, un des plus minces, en vibrions se rapprochant du type indien de Koch. Mais ces changements sont, le plus souvent, peu stables.

Les formes courtes se transforment de leur côté en vibrions minces et allongés. On les trouve souvent dans les vieilles cultures sur gélose, à côté des formes rondes bien connues. Mais, transportés dans un nouveau tube de gélose, ces vibrions reprennent leur forme originale et redeviennent courts et trapus.

Pour obtenir des changements durables, il faut que les vibrions soient soumis à des influences particulières agissant lentement, pendant un temps suffisamment long. Je choisirai, comme exemple particulier, la transformation du vibrion d'Angers.

D'abord, quelques mots sur l'origine de ce vibrion. En juin 1893, j'ai reçu un échantillon de matières fécales d'un Américain, arrivé de Nantes à Angers et atteint de choléra. Le cas était tout à fait typique au point de vue clinique, et reconnu par M. le Dr Bahuaud, qui soigna le malade, comme choléra asiatique. La maladie était très grave, mais le malade a fini par se rétablir complètement. Ce cas importé est resté isolé à Angers, et il ne s'est pas produit d'épidémie.

Ensemencées dans l'eau peptonisée et gélatinisée, les déjections ont donné une culture très riche de vibrion cholérique des

plus typiques. Comme forme, celui-ci appartient à la variété courte, trapue et recourbée en virgule, et se rattache au type original de Koch, ainsi qu'au plus grand nombre des vibrions cholériques connus. Cette particularité a déjà été signalée par M. Sanarelli (ces *Annales*, 1893, p. 726 et pl. XIII, B), qui a donné quelques détails sur ce vibrion d'Angers. Je renvoie le lecteur à son mémoire pour ce qui concerne la liquéfaction de la gélatine, la réaction indolnitreuse, etc. M. Sanarelli a mentionné la grande virulence de ce vibrion. Cette propriété est, en effet, très remarquable, et le microbe d'Angers est le plus virulent de tous les vibrions cholériques que je connais. Un centième d'une culture (développée pendant 17 heures sur la surface de la gélose inclinée, dans un tube de 1,5 centimètres de diamètre et de 12 centimètres de longueur), injecté dans la cavité péritonéale, suffit pour tuer un cobaye adulte en moins de 24 heures. Les vibrions se généralisent dans le sang, avec lequel on obtient une culture pure de ces microbes. Une demi-culture, injectée sous la peau du cobaye, est également mortelle, tandis qu'un quart de culture n'a pas suffi, dans ces conditions, pour tuer un cobaye de 272 grammes. Le vibrion d'Angers est très pathogène pour le lapin et le pigeon.

Cette virulence exagérée ne s'est maintenue que pendant quelque temps. Examinée plus tard, elle s'est montrée très atténuée. Ainsi une épreuve, faite 113 jours après l'isolement du vibrion, a démontré que même un quart de culture récente sur gélose ne suffit pas pour tuer tous les cobayes inoculés dans le péritoine. Malgré un certain renforcement par passage à travers des cobayes, le vibrion n'était plus capable de tuer des pigeons par inoculation dans le muscle pectoral. Une autre épreuve, faite 242 jours après l'isolement du vibrion, a montré que trois quarts d'une culture sur gélose, âgée de 25 heures, inoculés dans le péritoine d'un cobaye de 310 grammes, étaient insuffisants pour donner la maladie mortelle.

Cet exemple montre une fois de plus que la virulence du vibrion cholérique est une des propriétés les moins stables. En 8 mois le vibrion d'Angers, le plus virulent de tous ses congénères, est retombé à une virulence moindre que la moyenne. On voit bien jusqu'à quel point il est injuste de choisir cette propriété comme caractère différentiel du microbe cholérique.

Malgré ce changement si considérable de ses propriétés pathogènes, le microbe s'est conservé pendant tout le temps indiqué sous le même aspect morphologique de vibrion court et recourbé en virgule. Même l'influence des antiseptiques était impuissante pour le modifier sous ce rapport. Mais lorsque le vibrion d'Angers a été cultivé pendant longtemps dans de l'eau peptonisée à 1 0/0 et mis à l'étuve à 36°, au fur et à mesure que le liquide s'évaporait, la forme devenait de plus en plus mince et allongée. Lorsque le tube ne renferme que peu de liquide (5 à 6 c.c.), au bout de 25 jours, les vibrions ont déjà tellement modifié leur forme que, réensemencés sur la gélose, une grande partie présente l'aspect allongé et filiforme, tandis qu'un certain nombre de microbes conservent encore leur forme primitive de courtes virgules recourbées. On croirait d'abord à un mélange de culture de deux espèces différentes. Un ensemencement sur gélose, fait 43 jours après que la culture avait été préparée dans de l'eau peptonisée et abandonnée à 36°, a donné naissance à une culture composée presque exclusivement de filaments de longueur moyenne. Le vibrion d'Angers, si caractéristique par sa forme courte et recourbée de virgule, s'est transformé en un type nouveau, se rapprochant tellement du vibrion d'Ivanoff qu'on pourrait facilement les confondre. Au bout d'un mois et demi de séjour à l'étuve, dans le liquide devenu plus concentré qu'au début, il s'est produit une variété stable, rentrant tout à fait dans la catégorie des vibrions cholériques de Courbevoie, de Massaouah et de Paris, 1884. Dans des tubes qui renfermaient 10 c. c. et plus d'eau peptonisée, la même transformation s'est opérée dans un espace de temps plus long. Au bout de cette métamorphose, j'ai obtenu deux races du vibrion d'Angers très stables et en même temps très distinctes. On n'a qu'à jeter un coup d'œil sur les deux photographies de la planche X, pour s'assurer de la grande différence de la race primitive représentée par la fig. 1, faite d'après un 33e passage sur gélose, et de la race artificielle, représentée sur la figure 2, faite d'après une culture sur gélose du 34e passage.

Les deux races peuvent être semées sur la même plaque de gélose, où elles se développent également bien, mais où on peut les distinguer par la forme différente des vibrions. Même, semées sur d'autres milieux nutritifs, liquides et solides, les deux races conservent leurs particularités. Sur pomme de terre

acide, le vibrion d'Angers pousse assez bien à l'étuve, mais donne facilement des formes d'involution. Eh bien, ces formes anormales sont bien différentes dans les deux races. La race primitive produit dans ces conditions des corps gonflés en tonneau, courts et trapus, tandis que la race artificielle donne naissance à des cordons spirales de dimension extraordinaire. Sur gélose ordinaire, aussi bien que sur gélose glycérinée, en gélose sans viande (Sanarelli), en bouillon, dans de l'eau peptonisée à 1 0/0, dans ce liquide additionné de gélatine à 2 0/0, dans la gélatine ordinaire, partout les deux races se distinguent facilement l'une de l'autre. Sur des plaques de gélatine, les colonies de la race artificielle présentent une analogie frappante avec les colonies du vibrion d'Ivanoff; dans les deux cas, les contours sont beaucoup plus sinueux et irréguliers que d'habitude, ce qui tient probablement à la longueur démesurée des vibrions.

La virulence de la race artificielle s'est présentée comme au-dessous de la moyenne, comme celle de la race primitive à la même époque. Dans la cavité péritonéale du cobaye sensible, la race allongée a conservé sa forme, et les cultures, obtenues avec l'exsudat, ont manifesté également les particularités de la race artificielle.

Ces faits prouvent d'un côté une constance remarquable des caractères du vibrion acquis sous l'influence du changement des agents extérieurs; de l'autre côté, ils démontrent la grande variabilité du vibrion cholérique.

Lorsque j'ai soumis le vibrion, isolé par M. Mosny dans un cas de choléra à Brest et obligeamment mis par lui à ma disposition, aux mêmes influences que le vibrion d'Angers, je n'ai pas obtenu les mêmes changements qu'avec ce dernier. Peut-être serais-je arrivé à un meilleur résultat en prolongeant le temps de l'expérience? On sera peut-être tenté d'attribuer cette stabilité à la circonstance que le vibrion de Brest était d'une date beaucoup plus récente que le microbe d'Angers. Mais un vibrion du choléra de Cassino, également récent, que je dois à l'obligeance de M. Sanarelli, à Rome, s'est montré particulièrement polymorphe. Dans l'exsudat péritonéal des cobayes, auxquels il donnait la mort, ce vibrion se présentait sous des formes tellement différentes qu'on pouvait supposer un mélange de cultures. Les formes prédominantes et les plus remarquables présentaient

une ressemblance frappante avec les zoospermes des animaux : les vibrions étaient munis d'une tête grosse et ovale et d'une queue longue et très mince. Cette forme bizarre s'est maintenue pendant quelques générations : mais, à la suite de nombreux passages et de cultures renouvelées sur gélose ordinaire, les vibrions se sont transformés en un type uniforme de virgules minces et petites.

D'après tout cet ensemble de faits, il est donc impossible de nier que le vibrion cholérique pourrait être cité comme un exemple frappant du pléomorphisme, si répandu dans le monde des bactéries. Lorsqu'on discutait cette question si controversée, on insistait souvent sur la distinction qu'il fallait faire entre la variation des formes et la variation des espèces. Plusieurs bactériologistes distingués soutenaient que le pléomorphisme n'impliquait nullement le changement des espèces, et que chez les bactéries l'espèce était tout aussi nettement délimitée que dans la majorité des plantes et des animaux. Il faut reconnaître que les acquisitions de ces dernières années ont fortement ébranlé cette manière de voir. Il est évident qu'on ne peut plus penser, comme Naegeli, que toutes les bactéries ne présentent qu'un mélange bigarré de formes appartenant à une seule et même espèce. On ne peut même pas admettre l'ancienne opinion de M. Zopf, qui réunissait toutes les bactéries en un seul genre *bacterium*. Mais, d'un autre côté, il est incontestable que plus on approfondit l'étude des formes bactériennes, plus il devient difficile de les séparer en espèces bien distinctes : au lieu de celles-ci, on trouve des groupes plus ou moins vastes. Même les bactéries aussi caractéristiques que le bacille charbonneux ou le bacille de la tuberculose ne peuvent être nettement délimitées. Les formes atténuées du premier se confondent avec les bacilles inoffensifs du sol, tandis que le bacille de la tuberculose se sépare en deux catégories (bacille de la tuberculose humaine et aviaire), sans qu'on sache si celles-ci correspondent à des variétés ou des espèces. On peut donc admettre en général que s'il existe des espèces dans le groupe des bactéries, elles ne correspondent pas à des « bona species » en botanique et en zoologie, mais à de mauvaises espèces, comme le Planorbis multiformis de Hilgendorf et d'autres encore.

Il n'est point étonnant que dans ces conditions le diagnostic

bactériologique puisse présenter des difficultés presque insurmontables. Appliquées au cas particulier qui nous intéresse, le choléra, les données que nous avons réunies ne nous permettent pas de nous associer à plusieurs des opinions relatées dans notre premier chapitre. Comme les caractères essentiels du vibrion cholérique, tels que la forme, virulence, etc., sont extrêmement variables, il devient impossible de s'arrêter sur des qualités tout à fait secondaires, comme la durée de l'état réfractaire, ou la protection exercée par le sang d'un animal vacciné. Les propriétés des jeunes colonies sur plaques de gélatine ne peuvent présenter non plus le caractère de stabilité nécessaire pour la différenciation des espèces.

D'un autre côté la notion de la variabilité permet de résoudre certaines questions qui ne trouvent pas de solution sans elle. Pour citer un exemple, je me rapporterai au cas relaté dans le dernier mémoire de M. Gruber. Une personne arrivée de Trieste (où régnait alors — en 1886 — une épidémie de choléra asiatique) à Cilli tombe malade avec des manifestations cholériformes. Hoffman-Wellenhof isole des déjections un vibrion qui se distingue du vibrion cholérique par la longueur des filaments, persistante dans les cultures sur tous les milieux. M. Gruber considère ce type comme « sans aucun doute, identique avec le vibrion Ivanoff », et laisse indécis si ces deux formes doivent être considérées comme des vibrions cholériques. Pour moi il n'y a absolument aucune raison de le nier. Les particularités morphologiques du vibrion de Cilli sont communes avec celles de la race artificielle du vibrion d'Angers, incontestablement cholérique. La circonstance que la forme allongée du vibrion de Cilli s'est manifestée dès le début, tandis que la race d'Angers a été obtenue au bout d'une longue période, ne modifie nullement cette appréciation, surtout si l'on se souvient que les vibrions de Courbevoie et de Paris 1884 ont conservé leur forme mince et filamenteuse dans les déjections humaines.

Je ne m'arrête nullement devant la conséquence que le vibrion d'Ivanoff doit être considéré aussi comme vibrion cholérique. On a constaté à plusieurs reprises que des individus, dont les déjections renferment une grande quantité de vibrions cholériques incontestables, peuvent ne pas avoir le choléra. On ne conçoit pas pourquoi cette immunité ne pourrait point être

associée à la sensibilité envers la fièvre typhoïde. Grâce à l'obligeance de MM. Issaeff et Ivanoff, j'ai pu examiner en détail le vibrion d'Ivanoff, et je n'hésite pas de le ranger dans le groupe du vibrion cholérique. Cette admission est d'autant plus permise que la découverte de M. Ivanoff a été faite à Berlin à une époque où il se trouvait quelques cas suspects de choléra. Et cependant nous savons bien que le microbe cholérique peut se trouver à une période et dans des localités indemnes du choléra.

Parmi les vibrions des eaux qui liquéfient la gélatine et qui ont été découverts en dehors de toute épidémie cholérique, il se trouve sûrement des vibrions du vrai choléra. Je l'affirme pour certains vibrions découverts dans l'eau de la Seine, printemps et été 1893 (à une époque où il n'y avait pas de choléra), et décrits dans les mémoires de MM. Blachstein et Sanarelli (ces *Annales*, 1893, p. 689 et 693). Un de ces vibrions a même été trouvé dans l'eau de Seine qui alimentait Versailles, ville indemne vis-à-vis du choléra. Ce vibrion se rattache de très près au type des vibrions allongés, tels que les vibrions de Courbevoie, Massouah, etc., tandis qu'un second vibrion cholérique de la Seine, désigné par M. Sanarelli comme vibrion de Saint-Cloud, appartient au type des vibrions courts, en virgules.

Guidé par ces faits, je suppose que le vibrion de l'Elbe décrit par M. Dunbar, et sur la signification duquel il n'a pas pu se prononcer (voir la fin du premier chapitre de ce mémoire), doit être considéré également comme vibrion cholérique.

S'il faut admettre ainsi que le vibrion cholérique peut circuler dans les eaux, sans amener le choléra, et peut pulluler dans le canal intestinal de l'homme, sans que celui-ci manifeste des symptômes cholériques, il faut accepter aussi que, pour provoquer la maladie, le microbe spécifique doit se trouver dans des conditions particulièrement favorables. C'est une conclusion sur laquelle je reviendrai dans un prochain mémoire.

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DU VENIN DES SERPENTS

IMMUNISATION DES ANIMAUX ET TRAITEMENT DE L'ENVENIMATION

PAR LE Dr A. CALMETTE

Médecin de première classe des colonies.

(Travail du Laboratoire de M. Roux, à l'Institut Pasteur.)

I

J'ai exposé, dans un précédent mémoire[1], quelques résultats des recherches que j'ai effectuées à Saïgon sur le venin de *naja tripudians* ou *cobra capel*. Depuis cette publication, j'ai poursuivi l'étude des venins à l'Institut Pasteur, et c'est grâce à l'obligeance et aux conseils de M. Roux que j'ai pu fixer les bases d'une méthode à la fois préventive et thérapeutique de l'envenimation, qui donne des résultats excellents chez les animaux, et dont l'application à l'homme s'impose désormais.

J'ai pu expérimenter simultanément le venin de quatre espèces différentes de serpents : *naja tripudians*, de l'Inde et de l'Indo-Chine ; *hoplocephalus curtis* et *pseudechis porphyriacus* (serpent tigré et serpent noir) d'Australie ; vipère *pelias berus* de France.

La plus grande partie de mon venin de naja provient de Saïgon et m'a été fournie par vingt-six najas vivants auxquels j'ai enlevé les glandes à venin. Une partie du liquide obtenu par expression de ces glandes a été desséchée dans le vide. J'ai dilué le reste dans cinq fois son poids de glycérine pure à 30°. Ces deux lots de venin ont été enfermés aussitôt dans des tubes scellés.

L'activité de celui qui était dissous dans la glycérine est restée exactement la même depuis un an ; elle tue le lapin à une dose qui représente $0^{mgr},25$ de venin sec frais par kilogramme d'animal, tandis que le venin conservé à l'état sec depuis la même époque ne tue qu'à la dose de $0^{mgr},80$ par kilogramme[2].

1. Ces *Annales*, mars 1892.

2. Je dois à l'obligeance de M. le professeur Raphaël Blanchard un échantillon plus ancien de venin sec de cobra qu'il tenait lui-même de M. le professeur A. Gautier. Ce venin, recueilli depuis plusieurs années, n'est plus toxique pour le lapin qu'à la dose de $1^{mgr},30$ par kilogramme d'animal ; son activité est donc à peu près cinq fois moindre que celle de mon venin de Saïgon.

Le tableau suivant indique la toxicité relative, pour 1 kilogr. de lapin, des venins de différentes origines que j'ai expérimentés. J'emploie, pour désigner cette toxicité, une notation semblable à celle que MM. Behring, Roux et Vaillard ont adoptée pour la toxine tétanique, et qui est basée sur le nombre de grammes d'animal tué par 1 gramme de toxine.

1° Venin de *naja*............... . 0mgr,25 par kilogramme de lapin.
1 gr. de ce venin tue 4,000 kilogrammes de lapin; il a donc une activité de.. 4.000.000
2° Venin d'*hoplocephalus*[1]......... 0mgr,29 activité.... 3.450.000
3° — de *pseudechis*............ 1mgr,25 » 800.000
4° — de vipère *pelias berus*.... 4mgr » » 250.000

Bien entendu, cette évaluation du pouvoir toxique n'a rien d'absolu et elle varie considérablement suivant l'espèce animale sur laquelle on expérimente. Ainsi, le cobaye et, plus encore, le rat présentent une sensibilité extrême à cet égard. Il suffit, par exemple, de 0mgr,15 de venin de vipère pour tuer, en moins de douze heures, 500 grammes de cobaye. L'activité de ce venin vis-à-vis du cobaye est donc de 3,333,000, alors que, pour le lapin, elle n'est que de 250,000.

Le contraire se produit pour les espèces animales plus résistantes, telles que le chien. Il faut environ 10 milligrammes de venin de cobra pour tuer un chien de 6k,500, tandis que pour tuer le même poids de lapin, il suffit de 1mgr,65. L'activité toxique de ce venin qui, pour le lapin, est de 4,000,000, n'est donc plus que de 650,000 à l'égard du chien.

II

ACTION DE LA CHALEUR ET DES DIVERSES SUBSTANCES CHIMIQUES SUR LES VENINS

J'ai étudié séparément, sur chacun des venins que je viens d'énumérer, l'action de la chaleur et de diverses substances chimiques. Il n'existe pas entre eux de différences capitales : tous sont détruits ou modifiés par les mêmes réactifs, et tous

1. J'ai eu à ma disposition deux spécimens de ce venin : l'un a été adressé à M. Roux par M. Mac Garvie Smith, de Sidney, ainsi que le venin de pseudechis; l'autre m'a été remis obligeamment par M. le professeur Dastre, de la Sorbonne, et provient de la même origine.

perdent leur toxicité par le chauffage plus ou moins prolongé aux environs de 100°.

Le venin de cobra capel perd sa virulence exactement à partir de 98° après vingt minutes. Le venin d'hoplocephalus est un peu plus résistant; si on le chauffe, même pendant dix minutes, entre 100 et 102°, il est encore toxique et ne devient inoffensif que lorsque cette température est maintenue pendant quinze minutes au moins. Celui de pseudechis est détruit entre 99 et 100°; celui de vipère, entre 95 et 97°. La dose de ces venins chauffés, injectée aux animaux, était toujours de 1 milligramme pour ceux de cobra et d'hoplocephalus, de 4 milligrammes pour celui de pseudechis, et de 10 milligrammes pour celui de vipère.

Ces écarts, assez faibles pour des venins en solutions concentrées, deviennent plus considérables si l'on opère le chauffage sur des solutions très diluées. Ainsi, 1 milligramme de venin de cobra, dilué au 1/10,000 et chauffé au bain-marie, en tube scellé, à 90° pendant dix minutes, devient inoffensif pour le lapin. En dilution à 1/100, la même dose qui a subi l'action de la chaleur pendant le même temps tue seulement avec un léger retard, mais elle ne produit, au point d'inoculation, ni l'œdème, ni les hémorragies capillaires que l'on observe toujours à la suite des injections de venin non chauffé.

Le venin de vipère, chauffé dix minutes à 80°, comme l'ont montré MM. Phisalix et Bertrand, ne développe également plus d'œdème, quel que soit son degré de dilution, et pour tuer le lapin il faut en injecter au moins 6 milligrammes ou $0^{mgr},4$ au cobaye.

Le chauffage fait donc perdre aux venins leurs propriétés phlogogènes et une partie de leur pouvoir toxique : mais, pour des doses massives, trois ou quatre fois supérieures à la dose mortelle, ce pouvoir toxique n'est entièrement détruit qu'à des températures voisines de l'ébullition.

La soude et la potasse en solution à 1/10 diminuent beaucoup la toxicité des venins. Lorsque le contact est prolongé pendant cinq ou dix minutes, elles les détruisent même tout à fait, mais elles n'ont plus aucune action si l'on fait agir ces alcalis en solutions plus étendues, ou si on les mélange à du venin préalablement dilué.

Injectée dans les tissus autour du point d'inoculation, une solution de soude à 1/100 n'empêche pas l'intoxication et elle produit des douleurs extrêmement vives.

L'eau oxygénée, l'acide phosphorique, l'acide sulfhydrique et l'acide chlorhydrique n'ont aucune action *in vitro*.

Il en est de même du carbonate de soude et du carbonate d'ammoniaque en solutions à 1/10, même lorsqu'on mélange 100 parties de ces sels à une partie de venin. Le phosphate d'ammoniaque et le sulfate d'ammoniaque forment un précipité albumineux blanc qui est toxique.

Le persulfate d'ammoniaque ne forme pas de précipité, et le mélange de 1 partie de venin avec 20 parties d'une solution à 1/10 de ce sel ne tue plus. Mais les injections de persulfate d'ammoniaque dans les tissus sont impuissantes à empêcher l'absorption du venin inoculé.

L'eau iodée, la solution de Gram et le trichlorure d'iode à 1/1000 donnent un précipité brun également toxique. 1 milligramme de venin de cobra mélangé à 2 c. c. de solution de Gram tue le lapin dans le même délai que le venin pur.

L'eau bromée mélangée au venin détruit son pouvoir toxique; injectée dans les tissus, même dix minutes après l'inoculation, elle empêche encore l'envenimation, mais, au delà de ce délai, elle est inefficace.

On peut injecter l'eau bromée diluée au 1/3 sans produire d'abcès ni d'escharres, mais ces injections sont très douloureuses.

L'hypobromite de soude n'a aucune action modificatrice.

L'eau chlorée offre les mêmes propriétés et les mêmes inconvénients que l'eau bromée.

Les *hypochlorites alcalins* donnent des résultats bien supérieurs à ceux de toutes les substances signalées jusqu'ici comme antidotes du venin: il suffit de 3 gouttes d'une solution à 1/12 de chlorure de chaux solide ou d'hypochlorite de soude pour détruire immédiatement, *in vitro*, l'activité de 1 milligramme de venin de cobra ou de 10 milligrammes de venin de vipère dissous dans 1 c. c. d'eau.

On peut injecter de grandes quantités de ces hypochlorites dilués dans les tissus, dans les séreuses et même dans les veines sans provoquer aucun accident. Ils sont encore très efficaces lorsqu'on les injecte au bout d'un temps relativement très long après l'inoculation venimeuse, et à une grande distance du point inoculé.

Les hypochlorites de soude et de potasse, toujours fortement

alcalins, ont l'inconvénient d'occasionner d'assez vives douleurs, surtout si on emploie des solutions ordinaires du commerce, dont la teneur en chlore varie de 11 à 15 litres par 1,000 c. c.

Le chlorure de chaux solide, purifié, est d'un emploi plus commode; grâce à sa faible alcalinité, il n'irrite pas les tissus et ne provoque aucune souffrance chez les animaux.

Je me suis servi, dans la plupart de mes expériences, de solutions de chlorure de chaux au 1/12, titrant $4^{l},232$ de chlore par 1,000 c. c., et que je diluais, au moment de l'usage, dans 3 ou 5 parties d'eau; je ramenais ainsi la dilution à injecter au titre de $1^{l},410$ ou $0^{l},846$ de chlore par 1,000 c. c. On peut, dans ces conditions, en injecter de 10 à 30 c. c. aux lapins sous la peau ou dans le péritoine sans avoir à redouter aucun accident.

L'injection intraveineuse de cette même quantité d'hypochlorite est également bien supportée, mais elle ne réussit presque jamais à empêcher l'envenimation, tandis que l'injection sous-cutanée se montre toujours très efficace.

Chez les animaux inoculés avec une dose de venin mortelle en moins de 2 heures, on peut sûrement empêcher la mort en injectant la solution d'hypochlorite de chaux dans les 20 premières minutes après l'inoculation venimeuse. L'injection doit être faite, bien entendu, en piqûres disséminées autour du lieu d'inoculation, et en divers points du corps de l'animal.

Au delà de 20 minutes et jusqu'à une demi-heure, l'intervention est encore très souvent suivie de guérison. Passé ce délai, si on prend soin de soutenir l'énergie cardiaque avec une dose faible de morphine injectée sous la peau (1 centigramme par exemple pour le lapin), les phénomènes asphyxiques peuvent être retardés et permettre à l'hypochlorite d'exercer son action. J'ai traité ainsi des animaux avec succès 50 minutes après l'injection d'une dose de venin capable de les tuer en 1 heure et demie environ.

MM. Roux et Vaillard ont déjà observé les mêmes effets des hypochlorites alcalins à l'égard de la toxine tétanique, non seulement *in vitro*, mais même dans l'organisme des animaux inoculés avec des doses mortelles de cette toxine, et qui ont guéri à la suite d'injections répétées d'hypochlorites de soude ou de chaux.

Le chlorure d'or en solution au 1/100, que mes expériences

antérieures m'avaient conduit à recommander pour le traitement des personnes mordues, agit *in vitro* avec autant d'énergie que les hypochlorites, mais son action s'épuise beaucoup plus vite dans les tissus, et il ne permet d'arrêter l'envenimation que si on l'injecte peu d'instants (10 minutes environ pour le lapin) après l'inoculation du venin.

Le chlorure double d'or et de sodium et le chlorure de platine ne détruisent que très lentement les propriétés toxiques du venin. Le phosphate d'or ne les détruit pas du tout.

Le chlorure de platine, comme le chlorure d'or, forme avec le venin, désalbuminé par le chauffage pendant 15 minutes à 88°, un précipité brun clair, gélatineux, noircissant à la lumière. Ce précipité reste toxique pendant plus d'une heure au contact d'un excès de sel de platine. Peu à peu il devient ensuite inactif.

Si, sur un mélange toxique de 1 partie de venin désalbuminé par le chauffage, et de 10 parties de chlorure de platine, on fait agir immédiatement un courant d'hydrogène sulfuré, on trouve que ni le précipité de sulfure de platine, ni le liquide incolore que l'on en sépare par filtration n'ont de propriétés toxiques.

L'hydrogène sulfuré n'exerçant aucune action sur le venin, il faut donc admettre que celui-ci est détruit ou modifié par les composés chlorés qui se forment pendant la précipitation du platine à l'état de sulfure.

Il serait important de savoir par quel mécanisme les composés chlorés (hypochlorites, chlorure d'or) et l'eau bromée modifient les venins, ou s'ils les rendent inoffensifs par suite de leur propre effet sur le sang ou sur les cellules vivantes.

Mais la chimie du sang et celle des venins sont encore trop à l'état embryonnaire pour permettre dès maintenant une réponse à cette question. Nous allons voir toutefois que la seconde hypothèse puise une grande vraisemblance dans les faits que je vais exposer.

III

IMMUNISATION DES ANIMAUX CONTRE LE VENIN

Dans une communication à la Société de biologie (10 février 1894), j'ai mentionné les procédés à l'aide desquels on

peut donner aux animaux l'immunité contre l'envenimation, et j'ai montré qu'un animal immunisé contre l'un des venins que j'ai expérimentés, celui de cobra, par exemple, l'est aussi contre celui de vipère ou d'hoplocephalus, et réciproquement.

De leur côté, MM. Phisalix et Bertrand annonçaient (*Acad. des Sciences*, 5 février, et *Société de biologie*, 10 février 1894) qu'ils avaient réussi à donner au cobaye l'immunité contre le venin de vipère au moyen d'inoculations préventives de ce même venin chauffé à 80° au bain-marie pendant 5 minutes.

On peut donc rendre les animaux réfractaires à l'inoculation d'une dose mortelle de venin, soit par l'accoutumance à des doses faibles répétées, soit par le mélange d'hypochlorites alcalins ou de chlorure d'or avec le venin, soit par le venin modifié par la chaleur.

La première méthode réussit à donner une immunité très solide contre des doses considérables de poison, mais elle est lente et d'une application qui demande à être très surveillée. Si on injecte aux animaux des doses croissantes trop rapprochées, ils ne tardent pas à maigrir et succombent.

Le moyen le plus sûr d'éviter tout accident consiste à inoculer d'abord une quantité de venin égale à la moitié de la dose mortelle minima, 0mgr,25 de venin de cobra, par exemple, pour un lapin de 2 kilogrammes, et à laisser reposer l'animal pendant 12 à 15 jours. Si, après ce délai, il a repris son poids primitif, on renouvelle la même injection. Au bout de 6 jours, on peut injecter impunément 0mgr,50, dose mortelle pour un lapin neuf de même poids.

Six jours après, l'animal peut recevoir 0mgr,75 de venin, puis 1 milligramme. A partir de ce chiffre, on peut sans inconvénient augmenter chaque fois de 1 milligramme la quantité de venin, et en 2 mois on arrive à faire tolérer très facilement la dose énorme de 6 milligrammes injectée d'un seul coup, dose capable de tuer 24 kilogrammes de lapin.

On peut produire aussi sûrement l'accoutumance en injectant tous les 2 jours à des lapins, pendant 2 semaines, une dose très faible de poison, 1/16 milligramme de venin de cobra par exemple, puis ensuite des doses de plus en plus fortes ; ou, mieux encore, en insérant à demeure, sous la peau, un petit bâton de

craie imprégné de 4 ou 5 milligrammes de venin et entouré de collodion.

Cet expédient, dont je dois l'idée à M. Roux, permet de créer dans l'organisme de l'animal une sorte de glande artificielle, d'où le venin diffuse lentement et d'une manière continue, à travers la couche de collodion formant membrane dialysante.

Au bout d'un mois environ, l'immunité est assez solide pour permettre à l'animal de supporter sans malaise l'inoculation d'épreuve d'une dose mortelle.

La méthode d'immunisation par le venin modifié par la chaleur est beaucoup plus rapide, puisqu'elle permet en 48 heures de rendre un cobaye réfractaire à une dose mortelle, mais elle ne permet de vacciner ces animaux que contre une quantité de poison voisine de la dose minima mortelle.

En inoculant à des cobayes, tous les 3 jours, des doses croissantes de venin de vipère chauffé pendant 10 minutes à 80°, je n'ai pas obtenu de tolérance au delà de $0^{mgr},6$ pour ce venin chauffé.

Chez le lapin, la limite de la tolérance, dans les mêmes conditions, s'élève à 10 milligrammes ; lorsqu'on dépasse cette dose, l'animal maigrit brusquement et meurt en 2 ou 3 jours.

L'accoutumance à la toxicité pourtant affaiblie du venin chauffé ne se produit donc pas lorsqu'on renouvelle les injections à des intervalles si rapprochés.

On peut la réaliser, au contraire, exactement comme pour le venin non chauffé, en prenant soin de les espacer davantage, et on arrive alors facilement, en 25 jours, à faire tolérer au lapin 14 milligrammes de venin chauffé, puis 8 milligrammes de venin entier, et au cobaye 1 milligramme de venin chauffé, puis $0^{mgr},6$ de venin entier.

Dans ces conditions, on retombe dans le procédé d'immunisation lente par l'accoutumance, et on arrive toujours à constater que les animaux ne supportent jamais d'emblée une dose de venin entier égale à la dose de venin chauffé qu'ils ont reçue 3 jours auparavant.

Il est beaucoup plus facile et expéditif d'immuniser les animaux, en employant une méthode analogue à celle que MM. Roux et Vaillard ont utilisée pour produire l'état réfractaire au tétanos.

En injectant successivement à des lapins, sous la peau, à

des intervalles réguliers de 5 jours, une dose de 2 milligrammes de venin de cobra mélangée à une solution très étendue (1/60) d'hypochlorite de soude ou de chaux, en quantité décroissante, on obtient sûrement, au bout d'un mois, l'immunisation contre cette dose de 2 milligrammes de venin pur. On peut ensuite, sans aucun danger pour l'animal, renforcer son immunité par des injections progressives de venin répétées tous les 8 ou 10 jours, en augmentant chaque fois de 1 ou même de 2 milligrammes la quantité de venin injectée.

L'immunité contre une dose de venin simplement mortelle pour les animaux neufs peut s'obtenir encore de la manière suivante : si on inocule, sous la peau d'un lapin, 2 milligrammes de venin de cobra, dose capable de tuer en moins de 2 heures, et si, 20 minutes après, on traite l'animal par des injections thérapeutiques de chlorure de chaux dilué à 1/60, autour de l'inoculation venimeuse et en divers points du corps, le lapin ainsi traité résiste, après un malaise passager. Il maigrit d'abord pendant 6 à 8 jours, puis se rétablit complètement.

Si, après 2 semaines de repos, on l'éprouve par 1/2 milligramme de venin, il ne succombe pas. Ce lapin est dès lors vacciné pour cette dose de 1/2 milligramme, qui tue en 8 à 12 heures tous les témoins.

Pour que l'immunisation soit réalisée par cette méthode, il est tout à fait nécessaire que l'animal ait subi, entre l'inoculation venimeuse et le traitement, un commencement de malaise. Si le traitement suit de trop près l'introduction du venin, il n'y a pas d'immunité produite.

Le même résultat peut être atteint sans traitement consécutif, en se bornant à injecter, en une seule fois, une petite quantité de venin pur égale à la moitié de la dose capable de tuer en 12 heures un animal neuf. 2 semaines après, l'inoculation d'épreuve de la dose minima mortelle est supportée sans malaise.

Enfin, et j'insisterai tout à l'heure sur ce fait particulièrement intéressant, il n'est pas indispensable de recourir au venin lui-même, modifié ou non par la chaleur ou par des substances chimiques, pour conférer l'immunité. Certaines substances, telles que l'hypochlorite de soude et le chlorure de chaux, *sans mélange de venin*, injectées en petites quantités pendant 4 à 5 jours de suite sous la peau des lapins, produisent d'emblée l'état

réfractaire. Les animaux ainsi traités peuvent, après 6 jours, supporter une dose mortelle.

Les divers procédés que je viens d'exposer m'ont servi à immuniser des lapins, des cobayes et un chien. En opérant avec précautions et en pesant régulièrement les animaux afin de laisser reposer ceux qui maigrissent, il est facile d'arriver à leur faire supporter des quantités véritablement colossales de venin pur. Je conserve depuis 8 mois des lapins qui ont reçu chacun de 30 à 35 milligrammes de venin de cobra et qui sont en parfaite santé.

IV

PROPRIÉTÉS DU SÉRUM DES ANIMAUX IMMUNISÉS

Le sérum des animaux immunisés contre les venins par l'une quelconque des méthodes précédentes, possède des propriétés semblables à celles que MM. Behring et Kitasato, Roux et Vaillard ont constatées pour le sérum des animaux immunisés contre le tétanos et la diphtérie.

Ce fait, que j'ai déjà mentionné à la Société de Biologie (10 février 1894), a été observé en même temps par MM. Phisalix et Bertrand sur les cobayes vaccinés contre le venin de vipère par le procédé que ces expérimentateurs ont décrit.

Si on mélange *in vitro* 1 milligramme de venin de cobra ou 4 milligrammes de venin de vipère à une petite quantité de sérum d'un lapin immunisé, et qu'on inocule ce mélange à un lapin neuf, celui-ci ne présente, dans la suite, aucun malaise.

Il n'est même pas nécessaire que le sérum provienne d'un animal vacciné contre un venin de même origine que celui qu'on introduit dans le mélange : *le sérum d'un lapin immunisé contre le venin de cobra ou de vipère agit indifféremment sur tous les venins que j'ai expérimentés.*

L'action du sérum s'exerce aussi bien dans l'organisme, avant ou après l'envenimation, que *in vitro*. Injectons dans le péritoine ou sous la peau d'un lapin neuf 3 ou 4 centimètres cubes de sérum d'un lapin immunisé contre une dose vingt fois mortelle de venin, et aussitôt après inoculons dans les muscles de la patte une dose deux fois mortelle de venin pur. L'animal ne sera même pas malade; et si, après l'injection de

sérum préventif, nous attendons vingt-quatre ou quarante-huit heures avant d'introduire le venin, nous constaterons encore que celui-ci ne produit aucun effet toxique. Notre lapin est donc *immunisé* d'emblée par le sérum qu'il a reçu.

D'autre part, inoculons à un second lapin la même dose deux fois mortelle de venin pur, qui tuera un témoin à peu près en trois heures. Une heure, ou même une heure et demie après, alors que les symptômes de l'envenimation commenceront à se manifester (régurgitations, accélération du cœur, dyspnée, légère parésie des membres), injectons dans le péritoine et sous la peau en divers points du corps 6 ou 8 c. c. de notre sérum immunisant. L'animal reste pendant plus ou moins longtemps dans un état de malaise alarmant, caractérisé d'abord par un peu d'hypothermie, puis par une fièvre véritable. Sa température s'élève de 1°,5 ou 2° pendant quarante-huit heures, puis redescend graduellement à la normale. Tout accident est, dès lors, écarté, et si nous prélevons du sérum à ce lapin, nous constatons qu'il possède des propriétés préventives et antitoxiques.

Le sérum des animaux immunisés contre les venins est donc non seulement capable d'agir sur ces venins *in vitro*, mais il est encore préventif et thérapeutique, exactement comme celui des animaux immunisés contre la diphtérie ou le tétanos.

Le pouvoir antitoxique *in vitro* est naturellement très variable suivant la dose de venin contre laquelle l'animal qui fournit le sérum est immunisé. 1/2 c. c. de celui que j'emploie actuellement pour mes essais de thérapeutique, détruit exactement 1 milligramme de venin de cobra ou 12 milligrammes de venin de vipère.

L'injection préventive de 4 ou 5 c. c. de ce sérum à des lapins permet immédiatement à ces animaux de résister à une dose deux fois mortelle de venin pur ; l'immunité qu'ils acquièrent ainsi est tout d'abord très solide, mais elle disparaît dans un délai qui, dans mes expériences, n'excède pas six jours. Il est probable toutefois qu'avec les sérums plus actifs qu'il sera facile d'obtenir, on pourra dépasser beaucoup cette limite.

Quoi qu'il en soit, il demeure certain que l'immunité conférée par les sérums n'est pas durable, contrairement à celle qui est produite par les venins eux-mêmes, soit purs, soit mélangés aux hypochlorites alcalins. Cette dernière subsiste pendant un temps beaucoup plus long, mais je ne puis encore donner la

limite de cette durée. Les propriétés antitoxiques de ce sérum disparaissent si on le chauffe à 60°.

Le sérum d'un animal peut manifester des propriétés nettement préventives et antitoxiques à l'égard d'une dose mortelle de venin, sans que l'animal qui a fourni ce sérum soit immunisé.

Si nous injectons, par exemple, $0^{mgr},20$ de venin de cobra à un lapin pesant 2 kilogrammes, et que, trois jours après, nous prélevions son sang, nous trouvons que le sérum de ce lapin est préventif à la dose de 6 c. c. à l'égard de 1 milligramme du même venin injecté à un autre animal.

Fait plus remarquable encore, le sang d'un lapin succombant à l'envenimation à la suite d'un traitement trop tardif par le chlorure de chaux, est antitoxique *in vitro* à la dose de 6 c. c. à l'égard de 1 milligramme de venin.

Les propriétés préventives et antitoxiques du sérum ne sont donc nullement corrélatives de l'état d'immunité de l'animal producteur de ce sérum. Elles peuvent apparaître dans des conditions très différentes. On peut même constater qu'elles se développent chez des animaux qui n'ont pas reçu la plus petite trace de venin.

Injectons par exemple à deux lapins, pendant cinq jours de suite, une dose quotidienne de chlorure de chaux dilué, 1 c. c. d'une solution à 1/60. Si nous éprouvons, le 5e jour, par un milligramme de venin de cobra, l'un des lapins ainsi traités, nous voyons qu'il ne meurt pas. Prélevons alors du sérum à l'autre animal qui n'a pas reçu de venin. 14 c. c. de ce sérum, mélangés *in vitro* à 1 milligramme de venin, et injectés à un lapin neuf, ne le tuent pas, tandis que la même quantité de sérum normal, mélangée à 1 milligramme de venin, tue en 3 ou 4 heures. Donc, le sérum d'un lapin traité préventivement par le chlorure de chaux seul, sans venin, est antitoxique *in vitro*, probablement parce qu'il contient encore un peu d'hypochlorite.

V

TRAITEMENT DE L'ENVENIMATION

Nous avons vu que le sérum des animaux immunisés contre les venins, injectés plus ou moins longtemps après une inoculation venimeuse à des animaux neufs, est capable d'arrêter chez

ceux-ci les symptômes de l'envenimation et de les guérir, en communiquant à leur sérum des propriétés préventives et antitoxiques.

Inoculons à un certain nombre de lapins, sous la peau de la cuisse, une même dose de venin, 1 milligramme de venin de cobra par exemple, et traitons tous ces animaux, sauf quelques témoins, par des injections sous-cutanées et intrapéritonéales de sérum de lapins immunisés contre 4 milligrammes du même venin. Les témoins, non traités, meurent en 3 ou 4 heures.

Les lapins qui reçoivent 5 c. c. de sérum thérapeutique une demi-heure, trois quarts d'heure ou une heure après le venin, *résistent tous*.

Ceux qui reçoivent la même quantité de sérum thérapeutique entre 1 heure et 1 heure 1/2 après le venin résistent dans la proportion de 2 sur 3.

En injectant 8 c. c. de sérum, 1 heure 1/2 après l'envenimation, la guérison est encore la règle.

Passé ce délai, elle n'est plus possible, du moins avec les sérums relativement faibles dont nous disposons actuellement, parce que les éléments sur lesquels agit le venin sont sans doute déjà trop altérés ; mais le traitement amène toujours une survie de 30 à 48 heures.

Il est donc probable qu'avec des doses plus considérables de sérums plus actifs, cette limite de temps pourra être encore dépassée.

Néanmoins, tels qu'ils se présentent dès maintenant, les résultats de la *sérum-thérapie* appliquée à l'inoculation venimeuse sont assez engageants pour que l'on puisse affirmer que son efficacité est très supérieure à celle de tous les moyens thérapeutiques actuellement connus.

Puisqu'elle est capable d'arrêter si nettement l'intoxication chez des animaux d'une sensibilité extrême aux venins, comme le lapin et le cobaye, ne sommes-nous pas autorisés à penser que, chez l'homme, son efficacité ne serait pas moindre ?

Il convient donc de tenter le plus tôt possible des expériences de nature à nous éclairer sur la valeur pratique de cette méthode. La seule difficulté qui se présente ici est la nécessité de se procurer une quantité assez considérable de venins d'origines diverses pour immuniser de grands animaux, comme on

le fait aujourd'hui couramment pour la diphtérie et le tétanos.

Cette difficulté disparaît dans les pays où les serpents très venimeux abondent, en Australie, au Cap de Bonne-Espérance, et surtout dans l'Inde où, d'après les statistiques du gouvernement britannique, plus de vingt-deux mille personnes succombent chaque année aux morsures de ces animaux.

Il suffirait qu'on pût fournir à l'avance des provisions de sérum thérapeutique aux postes de secours médicaux qui fonctionnent dans la plupart de ces régions. Il ne serait probablement pas nécessaire que ce sérum soit immunisant à l'égard de tel ou tel venin particulier, puisque nous savons — du moins pour ceux que j'ai expérimentés — qu'un sérum préventif et thérapeutique à l'égard du venin de cobra ou d'hoplocephalus possède les mêmes propriétés à l'égard de celui de vipère ou de *pseudechis*[1].

Quoi qu'il en soit de l'avenir réservé à cette thérapeutique de l'envenimation par les sérums, on peut, d'après les expériences qui servent de base à ce travail, fixer de la manière suivante la conduite à tenir en présence d'un cas de morsure de serpent venimeux chez l'homme :

1° Placer, si la chose est possible, une ligature élastique modérément serrée entre la plaie d'inoculation et la racine du membre, afin de s'opposer à l'absorption du venin ;

2° Injecter aussitôt, dans la plaie d'inoculation et tout autour jusqu'à une assez grande distance, vingt à trente c. c. d'une solution récente de chlorure de chaux, préférablement au chlorure d'or dont l'efficacité est moindre ;

3° Enlever la ligature élastique dès que les injections ont été pratiquées ; laver la plaie abondamment avec une solution concentrée d'hypochlorite de soude ou de chaux.

Il sera avantageux de soutenir l'énergie cardiaque du blessé à l'aide d'une faible dose de morphine ou de caféine administrée par voie sous-cutanée.

On emploiera, pour les injections de chlorure de chaux ou d'hypochlorite de soude, une solution titrant environ 4 litres à 4 litres 5 de chlore par 1,000 c. c. Au moment de l'usage, on diluera 5 c. c. de cette solution dans 45 c. c. d'eau bouillie.

1. En attendant que ce résultat puisse être atteint, et pour me permettre d'effectuer d'autres expériences sur une plus large échelle, je fais appel au concours de tous les confrères qui pourraient me procurer des venins, soit secs, soit conservés dans de la glycérine pure.

Les dilutions étendues préparées d'avance n'ont plus d'action efficace.

Il n'y a aucun inconvénient à injecter dans le tissu cellulaire et même dans les muscles une assez grande quantité de chlorure de chaux ainsi dilué. Ces injections ne sont nullement douloureuses pour les animaux et elles ne provoquent jamais d'escharres.

J'ai constaté, dans mes expériences, que l'intervention simple à l'aide du chlorure de chaux, sans ligature, était toujours efficace pour le lapin, vingt minutes après l'inoculation sous-cutanée ou intramusculaire d'une dose de venin mortelle pour cet animal en deux heures.

Au delà de vingt minutes et jusqu'à cinquante minutes, l'intervention est encore très souvent utile.

Or, chez l'homme, il est extrêmement rare que la morsure des plus dangereux serpents soit mortelle dans un délai si court. D'après les statistiques de Fayrer, dressées sur un ensemble de 65 cas de morsures de serpents observées dans l'Inde et ayant amené la mort, la durée moyenne de la survie a été la suivante :

Moins de deux heures . . , ...	proportion de	22,96 0/0
Entre deux et six heures.	—	24,53 —
Entre six et douze heures	—	23,05 —
Entre douze et vingt-quatre heures. .	—	9,36 —
Au delà de vingt-quatre heures	—	21,10 —

En admettant qu'il soit impossible de porter secours en temps utile aux personnes classées dans la 1re catégorie ci-dessus, et qui succombent en moins de deux heures, on voit que le traitement a les plus grandes chances d'être efficace pour toutes les autres, soit pour 77,04 0/0 de celles qui seraient vouées fatalement à la mort.

Ce traitement, avec une substance aussi facile à se procurer que le chlorure de chaux, peut être dès maintenant appliqué partout et permettra de sauver un grand nombre de vies humaines.

Il est évident que les injections de sérum immunisant, dont la puissance thérapeutique est beaucoup plus grande, seront préférables encore. Elles devront constituer, dans l'avenir, le véritable traitement de l'envenimation. Les expériences dont je

cite quelques-unes à la fin de ce mémoire et que j'ai répétées un grand nombre de fois depuis le mois de décembre dernier, sont tellement concordantes que je me suis employé, depuis cette époque, à préparer de grandes quantités de sérum thérapeutique que je mettrai volontiers à la disposition des médecins de nos colonies bien placés pour l'expérimenter.

Ces sérums réussissent, en effet, à arrêter l'envenimation même avancée chez les divers animaux d'expérience que nous avons éprouvés : il est donc probable que leur action sera la même sur l'homme. C'est ce but pratique que nous avons eu surtout en vue et que nous pensons avoir atteint.

APPENDICE

Je donne ici le résumé de quelques-unes de mes expériences de traitement de l'envenimation par le chlorure de chaux et par le sérum de lapins immunisés.

1° Chlorure de chaux.

La solution employée est au 1/12. Au moment de l'injecter, on en dilue 5 c. c. dans 45 c. c. d'eau.

1re série. — Lapin n° 1, *témoin*. — P. 1k,940. — Inoculé 1 milligramme de venin de cobra sous la peau de la patte postérieure droite à 11 h. du matin. Mort à 2 h. 45.

Lapin n° 2. — P. 1k,775. — Même inoculation de venin à 11 h. à la patte postérieure droite. Traité 15 minutes après par 8 c. c. de la dilution de chlorure de chaux en 4 injections disséminées autour de la première inoculation et à la fesse droite. Guérison.

Lapin n° 3. — P. 1k,640. — Même traitement que le n° 2. Guérison.

Lapin n° 4. — P. 1k,900. — 1 milligramme de venin à la patte postérieure droite. Traité 30 minutes après par 8 c. c. de la dilution de chlorure de chaux. Mort seulement 8 jours après l'inoculation. Amaigrissement et paralysie des membres postérieurs depuis trois jours. Diarrhée. Aucune lésion spécifique à l'autopsie.

2e série. — Lapin n° 1, *témoin*. — P. 1k,880. — 2 milligrammes de venin de cobra à la cuisse droite (injection intramusculaire) à 11 h. Mort à 3 h. 50.

Lapin n° 2. — P. 1k,770. — 2 milligrammes inj. intramusculaire, cuisse droite. Traité 20 minutes après par 8 c. c. de la dilution de chlorure de chaux en 8 injections disséminées dans la cuisse et le flanc droit. Guérison.

Lapin n° 3. — P. 1k,800. — Même inoculation à 11 h. 12. Traité 25 minutes après par 8 c. c. de dilution de chlorure de chaux. Mort dans la nuit suivante.

Lapin n° 4. — P. 1k,720. — Même inoculation à 11 h. 18. Traité 30 mi-

nutes après par 10 c. c. de dilution de chlorure de chaux. Mort dans la nuit suivante.

Lapin n° 5. — P. 1k,820. — Même inoculation à 11 h. 20. Traité 30 minutes après par 12 c. c. de dilution de chlorure de chaux. Guérison.

3e sérum. — Lapin n° 1. — P. 1k,920. — Inoculé sous la peau de la patte droite postérieure, avec 2 milligrammes de venin. Reçoit 10 minutes après 1 centigramme de morphine sous la peau du ventre.

Traité 40 minutes après l'inoculation de venin par 8 c. c. de dilution de chlorure de chaux. Guérison.

Lapin n° 2. — P. 1k,680. — Inoculé sous la peau de la patte droite postérieure, avec 2 milligrammes de venin. Reçoit 10 minutes après 1 centigramme de morphine sous la peau du ventre. Traité 50 minutes après l'inoculation de venin par 10 c. c. de dilution de chlorure de chaux. Guérison.

2° Traitement par le sérum.

Le sérum employé provient de cinq lapins immunisés contre 20 à 26 milligrammes de venin de cobra.

Lapin n° 1. — P. 1k,870. — Inoculé à la patte droite postérieure, avec 1 milligramme de venin. 30 *minutes après*, injection sous-cutanée de 6 c. c. de sérum immunisant, sous la peau du ventre. Guérison.

Lapin n° 2. — P. 1k,780. — Inoculé à la patte avec 1 milligramme de venin. Traité 1 h. 05 après par injection de 6 c. c. de sérum, moitié sous la peau du ventre, moitié dans le péritoine. Guérison.

Lapin n° 3. — P. 1k,830. — 1 milligramme de venin à la patte postérieure droite. Traité 1 h. 15 après, par 6 c. c. de sérum sous la peau du ventre. Guérison. Le sang de ce lapin, prélevé six jours après, est antitoxique *in vitro* à la dose de 2 c. c. pour 1 milligramme de venin.

Lapin n° 4.— P. 1k,550.— 1 milligramme de venin à la patte droite. Traité 1 h. 20 après par 6 c. c. de sérum sous la peau du ventre. Mort seulement après plus de 8 heures.

Lapin n° 5.— P. 1k,900.— 1 milligramme de venin à la patte. Traité 1 h. 31 après, par 8 c. c. de sérum. Guérison.

Lapin n° 6. — P. 2k,220. — 1 milligramme de venin à la patte. Traité 1 h. 17 après par injection sous-cutanée de 2 c. c. seulement de sérum d'un lapin immunisé, qui a reçu un total de 26 milligrammes de venin de cobra. Guérison. (Ce sérum est antitoxique *in vitro*, à la dose de 1/2 c. c. pour un milligramme de venin de cobra.)

Un lapin témoin, du poids de 2 kil., qui reçoit en même temps que les précédents 1 milligramme de venin de cobra, et qui n'est pas traité, meurt en moins de 3 heures et demie.

Cobaye mâle. — P. 0k,510. — Inoculé sous la peau de la cuisse droite, avec 1 *milligramme de venin de vipère*. Reçoit dans le péritoine, 5 minutes après, 2 c. c. de sérum de *lapin immunisé contre le venin de cobra*, et antitoxique à la dose de 1/2 c. c. pour 1 milligramme de venin. Guérison.

LE MICROBE DE L'OZÈNE

PAR LE Dr LŒWENBERG.

(Travail du laboratoire de M. METCHNIKOFF à l'Institut Pasteur).

Galien, Hippocrate, Averroës et d'autres médecins de l'antiquité connaissaient déjà une maladie des fosses nasales qui empoisonne l'existence des malheureux qu'elle frappe, et en fait des objets de dégoût pour tous ceux qui les approchent. C'est l'*ozène*, ou la *punaisie*.

Datant généralement de l'enfance du sujet, elle ne le quitte plus durant toute sa vie, et imprime d'une façon permanente à son haleine une odeur fade et nauséabonde *sui generis*, pire que les émanations de la putréfaction même. Elle adhère jusqu'aux mouchoirs des malades, et j'ai cité, dans un premier travail sur l'ozène[1], l'observation d'une jeune fille du monde dont les blanchisseurs refusaient les mouchoirs, que la malheureuse se voyait obligée de brûler.

A une époque peu éloignée où l'on ne pensait pas encore à explorer l'intérieur du nez, on croyait l'affection en question due à des ulcérations dans les fosses nasales. Depuis, le jour s'est fait, au moins quant aux lésions qui constituent la maladie. Elle ne s'accompagne pas d'ulcérations, mais d'altérations bien plus curieuses : dans le cours de l'ozène, la *muqueuse* qui tapisse l'intérieur du nez, d'épaisse et pleine de suc qu'elle est normalement, s'*atrophie* et finit par être réduite à une mince pellicule, couverte, par places, de croûtes extrêmement adhérentes dans lesquelles se concentre le *foetor* caractéristique.

Les os mêmes de la charpente nasale subissent le processus atrophiant; les cornets se réduisent à de minces bourrelets. En échange, grâce à ce rapetissement des os, les méats nasaux

1. B. LOEWENBERG, De la nature et du traitement de l'ozène (3e *congrès otologique international*. Bâle, 1884; reproduit dans l'*Union médicale*, 1884.)

s'élargissent et permettent à l'observateur de voir le fond du pharynx nasal.

Dès l'année 1880, j'ai étudié cette mystérieuse affection, surtout du côté microbiologique, et j'ai publié les résultats de mes premières recherches dans le travail cité plus haut. Comme je l'avais déjà fait entrevoir, d'ailleurs, au Congrès médical international de Londres (1881), dans la discussion des communications sur cette affection, j'avais constamment trouvé dans le mucus nasal des punais un microbe spécial, unique et caractéristique. Voici quelques passages de ce travail, qui résument la description du microorganisme :

« C'est un très gros coccus immobile, associé toujours, pour ainsi dire, en doubles, et ceux-ci souvent accouplés en chaînes. Ces chaînes sont réunies par une masse hyaline. Quelquefois la section optique (des microbes) est presque rectangulaire, comme s'ils étaient cylindriques, au lieu d'être amincis et arrondis aux deux extrémités[1]. En les examinant avec les plus forts grossissements, après les avoir colorés, surtout au violet de gentiane, j'ai quelquefois reconnu vers leur milieu une zone transversale plus claire.

« Quant à la *méthode d'examen*, il n'est pas besoin de préparation spéciale pour trouver ce microbe ; le premier coup d'œil jeté sur une parcelle de mucus ozénique le montre généralement en quantités innombrables. Je recommande cependant de choisir des couches minces et surtout de prendre *les filaments muqueux* que j'ai toujours vus tendus entre le septum et les cornets. *Je conserve des préparations où ces filaments, simplement étalés sur le porte-objet et colorés avec une couleur d'aniline, ne montrent pas autre chose,* — en dehors de quelques leucocytes, bien entendu, — *qu'une multitude infinie de diplococcus exactement pareille à une culture pure,* etc. (j'ai montré des préparations de ce genre au congrès de Bâle).

« Les couleurs d'aniline donnent des images magnifiques, surtout la fuchsine et le violet de gentiane. *Le microbe ne se colore pas par la méthode de Gram.*

1. J'avais donné le nom de coccus à ce microbe, de même que Friedlaender avait nommé pneumocoque celui qu'il a découvert, et auquel le mien ressemble d'une façon frappante, mais je signalais en même temps, comme on vient de le voir, les caractères qui permettaient de l'appeler soit un coccus, soit un bacille court et trapu. Je le nommerai donc désormais *cocco-bacille de l'ozène.*

« Dans un seul cas (petite fille chétive de huit ans), j'ai vu, outre le coccus caractéristique, de très nombreux bacilles; j'ai constaté la même chose dans des examens fréquemment répétés chez la même enfant. J'ajoute que, dans ce seul cas, le mucus nasal était neutre, tandis que, dans tous les autres, il bleuissait le papier rouge de tournesol. Quant aux autres symptômes et aux résultats thérapeutiques, ce cas ressemblait à tous ceux que j'ai observés. *Le coccus ressemble à celui de la pneumonie infectieuse* (ce qui, à l'époque où ce travail fut publié, signifiait : au pneumobacille de Friedlaender). »

J'arrête ici ces citations qui renferment les principaux caractères du microbe de l'ozène, tels que je les ai énoncés en 1884. Au point de vue morphologique, il n'y aurait guère de traits à ajouter. J'avais cependant été frappé, dès mes premières recherches, de ce que ce microorganisme, tel qu'il se présente dans le mucus ozénique, se montre la plupart du temps *encapsulé*, et je faisais déjà allusion à ce fait en disant que « les chaînes formées par ce microbe sont réunies par une masse hyaline » (v. la citation ci-dessus).

Je ne voulais d'abord parler *in extenso* de cette capsule qu'après une étude complète de tous ses caractères, mais je me suis bientôt décidé à annoncer la découverte de cette enveloppe dans une note accompagnant la présentation de mon opuscule sur l'ozène à la Société des sciences médicales de Gannat (Allier).

Dans cette note, je décrivais expressément, ainsi que cela ressort des comptes rendus de la Société, *autour des coccus, une zone claire, une capsule*[1].

Cette présentation a été faite en février 1885. Or, au mois d'août de la même année, le Dr Klamann, de Luckenwalde, a décrit des coccus encapsulés dans l'ozène[2], sans mentionner ma description antérieure qui lui avait certainement échappé. Omission analogue de la part du Dr Thost qui, un an plus tard, décrivit[3] dans l'ozène un microbe absolument pareil au mien.

1. Voir *Comptes rendus des travaux de la Société des sciences médicales de Gannat (Allier)*, année 1884-1885. p. 97. Paris, A. Delahaye et Lecrosnier, 1885.
2. *Allgemeine medicinische Centralzeitung*, 20 août 1885.
3. *Deutsche medicinische Wochenschrift*, n° 10, 1886.

I

ÉTUDE BACTÉRIOLOGIQUE DU MICROBE DE L'OZÈNE

Quand on ensemence avec du mucus ozénique un des milieux de culture ordinaires, en vue d'étudier le microbe spécial, le mieux est, comme je l'ai conseillé jadis pour les préparations microscopiques, d'emprunter une petite parcelle à un des filaments muqueux mentionnés plus haut [1].

Sur plaques de gélatine, il se développe déjà, à la température ordinaire, des colonies quelquefois tellement abondantes que toute la masse en est parsemée.

Ces colonies peuvent se montrer — dans la même plaque — sous *deux aspects différents* :

1° De petites colonies rondes, *jaunâtres*, d'apparence compacte, situées dans l'épaisseur de la gélatine (cette catégorie manque souvent) ;

2° De colonies plus grandes, demi-transparentes, d'un *blanc plus ou moins laiteux*, qui occupent la surface de la masse ; ces colonies ne manquent jamais.

D'abord circulaires, celles-ci prennent quelquefois, en augmentant de volume, des contours ovoïdes, pyriformes, ou encore plus irréguliers quand elles arrivent au contact les unes des autres. Après un certain temps, la substance de ces colonies devient plus laiteuse ou légèrement jaunâtre. Quelquefois, à mesure que la dessiccation de la gélatine s'avance, elles prennent un aspect grumeleux ou coupé de cercles concentriques (pareil à celui d'un grain d'amidon de pomme de terre vu au microscope).

La masse des colonies n° 2 paraît souvent molle, comme semi-liquide.

Ni les colonies n° 1, ni celles n° 2 ne liquéfient la gélatine, propriété qui fait absolument défaut au microbe de l'ozène.

En poussant cette étude plus loin, on peut se convaincre aisément qu'en réalité les deux groupes de colonies ne forment qu'une

1. Quant à la formation de ces fils muqueux, elle est due, à mon avis, à la viscosité particulière des masses sécrétées dans l'ozène. Lorsque le malade, en se mouchant, parvient à les expulser, il en adhère aux deux parois opposées de la fosse nasale des résidus réunis entre eux par un de ces filaments, qui résistent, tenaces, aux expirations forcées. Dans les autres affections de l'intérieur du nez, ces fils, d'après mon expérience, manquent, ou, du moins, se montrent beaucoup plus rarement.

seule espèce : elles montrent le même microbe; les colonies n° 1, lorsqu'elles sont situées assez superficiellement pour pouvoir, en grandissant, arriver au contact de l'air, prennent, en y parvenant, la forme et la coloration de celles de la deuxième classe; en ensemençant de nouvelles plaques avec l'une ou l'autre espèce de colonies, on obtiendra ainsi toujours de nouveau les deux sortes; enfin on peut transformer artificiellement le n° 1 en n° 2; pour cela on n'a qu'à piquer avec le fil de platine préalablement flambé une des colonies jaunes situées dans l'épaisseur de la gélatine. En facilitant ainsi l'accès de l'air, on voit bientôt fuser vers la surface une traînée blanche qui part de la colonie piquée et finit par former une des agglomérations blanches n° 2. C'est donc la position à la surface ou dans la profondeur qui donne à ces colonies leurs apparences diverses.

Voilà les seules colonies que la culture du mucus donne constamment dans l'ozène.

Ce fait concorde avec celui que j'ai cité plus haut, en disant que les préparations microscopiques faites avec ce même mucus présentaient déjà (presque toujours) l'aspect d'une culture pure du cocco-bacille spécial.

En dehors du microbe caractéristique, on trouve bien dans quelques-unes des cultures des colonies d'autres microorganismes, mais qui, chose importante, sont différents selon les cas et, par conséquent, ne jouent aucun rôle dans l'ozène.

Il résulte de ce qui précède que c'est bien un microbe particulier unique et bien défini qui caractérise l'ozène, et l'examen microscopique des cultures prouve, de plus, que c'est bien le cocco-bacille décrit par moi en 1884. C'est lui qui forme les deux espèces de colonies, mais on l'y voit souvent sans capsule.

Ce fait n'a rien d'étonnant, car les microbes qu'on trouve encapsulés dans le sang ou le parenchyme des organes ou à la surface des muqueuses, n'offrent pas toujours ce caractère dans les cultures. Nous allons d'ailleurs développer ce point davantage plus loin.

Lorsqu'on ensemence ce microorganisme par *piqûre dans la gélatine*, on voit se former, au bout de peu de temps, tout le long du passage du fil de platine, une bande contenant plusieurs rangées parallèles de grains plus ou moins fins, de couleur jaunâtre. A la surface de la gélatine, il se forme un disque d'un

blanc opaque, qui envahit graduellement une étendue plus ou moins grande. Il s'épaissit en même temps, mais généralement sans atteindre la forme de tête de clou exubérante qui caractérise le pneumobacille.

Lorsque la culture se dessèche, elle finit par être coupée au milieu par une fente profonde dont les surfaces intérieures, en contact avec l'air, se revêtent de la même substance blanchâtre qui forme le disque supérieur surmontant la culture fraîche.

Même dans des cultures desséchées, le microbe conserve sa vitalité pendant plusieurs mois. Il est d'ailleurs tellement résistant qu'il pousse même sur de la gélatine à réaction acide. Il se cultive jusqu'à la température de 43°,4. La limite supérieure est vers 44°. Étalé en couche mince, il meurt au bout d'une minute de contact avec de l'eau à 54°. J'utilise cette propriété pour le traitement de l'ozène au moyen d'injections nasales chaudes.

Sur gélose, le microbe forme une couche unie d'un blanc sale tirant sur le gris.

Elle paraît luisante et comme moite, et est, en effet, souvent semi-liquide. Les colonies isolées forment des disques d'un blanc grisâtre un peu opalescent. Sous un faible grossissement, elles présentent, comme d'ailleurs toutes les colonies isolées de ce microbe, un contour circulaire et un aspect uniformément grenu.

En piqûre dans la gélose, le microbe ne forme pas de disque en « tête de clou », mais un enduit blanc grisâtre, opalescent, d'épaisseur égale sur toute la surface.

Sur le *sérum* humain ou animal, les cultures ressemblent beaucoup à celles sur gélose.

Ensemencé dans du *bouillon* peptonisé (sucré ou non), le microbe forme lentement, au fond, un petit dépôt, composé souvent de grumeaux et de filaments, au-dessus duquel le liquide paraît clair. Le bouillon ne dégage pas de gaz et reste alcalin.

Le cocco-bacille de l'ozène se développe très bien sur *la pomme de terre.* Il commence par y former des traînées blanchâtres ou jaunâtres, d'apparence grasse, qui s'étalent, souvent, au point de confluer. Plus tard, elles deviennent de plus en plus foncées et finissent par prendre une coloration tout à fait brune qui se communique même à la masse de la pomme de terre. Les colonies restées isolées ont d'abord l'apparence de gouttelettes ou de petites perles d'un blanc tirant sur le jaune.

En culture anaérobie, le microbe pousse bien, mais plus péniblement qu'à l'air, et forme quelquefois des colonies fusiformes.

La maladie caractérisée par ce microbe, présentant comme signe particulier la production de *l'épouvantable odeur* si connue, il était extrêmement important de rechercher si les cultures pures du microorganisme spécial donnent des produits odorants, et, surtout, si elles produisent les exhalaisons propres à l'ozène. Dans mes publications antérieures, je n'ai pas touché ce point; c'est donc à tort qu'on m'a fait dire que les cultures du microbe spécial donnent l'odeur du mucus ozénique.

Par contre, les recherches auxquelles je me suis livré dans ces dernières années m'ont donné le résultat curieux que *ce microbe donne dans presque tous les milieux de culture des produits odorants, et, fait bien inattendu, que les odeurs qu'il dégage sont dans la majorité agréables*. Ainsi, sur les plaques de gélatine un peu vieilles, il exhale un parfum ressemblant à celui des fleurs de sureau ou de celles du troëne (*Ligustrum vulgare*). Même chose pour les cultures sur gélose. En piqûres dans la gélatine, un peu vieilles, même odeur. Je n'ai pas trouvé de senteur appréciable aux cultures dans du bouillon peptonisé (sucré ou non). Sur pommes de terre, le microbe produit une odeur aromatique comparable à celle du sambayon (*sambaglione*, sauce au vin blanc). Sur le sérum, il donne également une odeur aromatique, comme éthérée.

Les cultures du microbe donnent donc, avec les milieux ordinaires usités en bactériologie, des senteurs nettement caractérisées et agréables, tandis que, dans les fosses nasales des malheureux atteints d'ozène, il produit une des puanteurs des plus répugnantes. Ce n'est qu'en semant le microbe sur de la viande fraîche ou stérilisée par la chaleur que j'ai obtenue, en plaçant les tubes de culture à l'étuve, une odeur très désagréable. Pourtant elle ne rappelait pas l'ozène, mais ressemblait à l'odeur de la putréfaction avec une légère addition de senteur ammoniacale. En culture anaérobie, le microbe donne également quelquefois une odeur désagréable, différente de celle de l'ozène.

Que faut-il conclure de cet ensemble de faits?

Si le microbe produit dans les fosses nasales des ozéneux l'épouvantable odeur que l'on sait, et si, d'autre part, sa culture dans les milieux usités en bactériologie ne la reproduit pas,

il ne s'ensuit pas, comme certains auteurs l'affirment, que le microorganisme que j'ai découvert ne soit pas le facteur de l'odeur (et de la maladie). D'une part, le fait qu'il donne des senteurs avec pour ainsi dire toutes les substances nutritives est déjà assez significatif. D'autre part, si l'on passe en revue les maladies qui s'accompagnent de la production d'une odeur particulière et de la présence d'un microbe spécial, on constate qu'aucune des cultures du microorganisme propre à chacune de ces affections ne donne l'odeur créée par celles-ci, si ce n'est celui de la bronchite putride.

Si donc les cultures du cocco-bacille de l'ozène ne reproduisent pas les exhalaisons caractéristiques pour cette affection, il ne faut pas en conclure qu'elles ne soient pas dues *in vivo* à l'action de ce microbe, mais il faut admettre, d'une façon générale, que nos milieux de culture habituels, tout en permettant à certains microbes de pulluler, ne réalisent point les conditions que la nature leur fournit dans l'organisme.

J'ai tenté de me rapprocher davantage des conditions de vie habituelles au microbe en essayant de le cultiver sur des *milieux naturels*, tels que le sérum humain, la viande crue, l'œuf de poule, et même le mucus nasal stérilisé ; mais sur aucune de ces substances l'odeur ozénique ne s'est produite.

La capsule dans les cultures ozéniques. — Le microbe de l'ozène est généralement encapsulé quand on l'examine dans le mucus nasal des malades, et *toujours* dans le sang des animaux morts à la suite de son injection. Quand on colore une couche mince de ce sang à la fuchsine (solution de Ziehl, par exemple), les capsules restent généralement blanches, tandis que la solution de Ribbert les teint presque toujours admirablement.

La présence de cette enveloppe dans les cultures est fort variable : tantôt elle existe, tantôt, dans les ensemencements faits sous les mêmes conditions, on ne la constate pas, quel que soit d'ailleurs le milieu choisi (sang, viande, œuf, gélose, gélatine, etc.).

Nous avons vu plus haut que quelquefois d'autres microbes que celui de la punaisie éclosent, à côté de lui, sur les plaques ensemencées avec du mucus ozénique, mais qu'ils ne forment jamais qu'un nombre insignifiant de colonies, par rapport à celles

du cocco-bacille spécial, et, fait important, que c'est tantôt telle espèce, tantôt telle autre qui éclot; il ne s'agit donc là que d'hôtes accidentels, amenés dans les fosses nasales par l'air inspiré.

La rareté, chez les ozéneux, de microbes autres que celui qui caractérise l'affection, surprend de prime abord, car chaque inspiration fait passer dans les méandres nasaux un grand nombre de germes de l'air qui sont arrêtés et retenus par la muqueuse nasale, surtout dans l'ozène où la sécrétion est particulièrement gluante. Il fallait donc s'attendre, *a priori*, à voir éclore, dans les cultures faites avec du mucus nasal quelconque, les échantillons les plus variés de la flore des microbes. Eh bien, l'examen bactériologique souvent répété et portant sur bien des sujets, des produits de la membrane de Schneider, m'a démontré qu'il n'en est rien. Le mucus nasal normal montre peu de microorganismes, et il en est de même, d'après mes recherches, pour la plupart des affections intranasales, autres que celles dont traite ce travail. J'ai constaté ce fait, par exemple, dans un cas de *syphilis tertiaire du nez*, appelé improprement *ozène syphilitique*, avec nécrose étendue des cornets et du plancher du nez. Là encore, le pus, extrêmement fétide et sécrété en abondance, contenait peu de microbes, et ni les préparations microscopiques, ni les cultures ne ressemblaient à celles de l'ozène vrai. J'ajoute, en passant, que l'odeur insupportable produite par cette affection vénérienne des fosses nasales était toute différente de celle de la punaisie, et avait plutôt quelque chose d'excrémentitiel. Les quelques microbes trouvés dans le pus nasal de ce malade ne possédaient pas les caractères de ceux de l'ozène ; ils n'offraient pas non plus ceux des bacilles de Lustgarten.

Dans l'ozène vrai, contrairement à d'autres affections intranasales, le mucus est peuplé par le cocco-bacille particulier, qui, non seulement domine sur toute la surface interne du nez, mais est encore abondant dans le pharynx nasal (*loc. cit.*, p. 10).

Le microbe de l'ozène et le pneumobacille comparés au point de vue de leurs cultures artificielles. — Dès mes premières recherches sur l'ozène, j'ai été frappé de la ressemblance du microbe que je venais de découvrir dans cette maladie, avec celui que Friedlaender avait trouvé dans la pneumonie. Même forme, même

capsule, même coloration par les couleurs d'aniline et même décoloration par le procédé de Gram. Aussi ai-je déjà signalé cette ressemblance dans mon premier travail (v. le passage cité page 294).

Peu de temps après, M. Klamann (*loc. cit.*) disait qu'il est possible que les deux soient identiques, et M. Thost (*loc. cit.*), faisant un pas de plus, affirmait qu'ils ne forment qu'un seul et même microbe. Dès lors on a pris l'habitude de considérer le microbe de l'ozène comme un pneumobacille atténué.

Il est vrai que, non seulement ils paraissent pareils dans les préparations microscopiques, mais que leurs cultures présentent également les plus grandes ressemblances. Cependant une étude attentive et prolongée de cette importante question m'a fait découvrir entre les cultures des deux microbes les divergences suivantes :

1° Pour ce qui est des cultures sur gélose de l'un et de l'autre, celles du pneumobacille ont souvent les bords comme festonnés, et la bande formée par la masse des cocco-bacilles ressemble vaguement à un fragment de ténia ou (pour ceux familiarisés avec la faune des flaques d'eau de nos forêts), aux planarias. Les cultures du microbe de l'ozène ont des bords rectilignes et la surface lisse, d'un luisant humide. Les colonies isolées du cocco-bacille sur gélose sont plus claires et plus blanchâtres que celles de l'autre microbe, qui paraissent plus opaques et tirent un peu sur le jaune. Il en est de même pour l'ensemble de la culture. La masse est plus diffluente chez le microbe de l'ozène que dans le pneumobacille, et descend le long du tube chez le premier ;

2° *Ensemencé dans du lait stérilisé*, le cocco-bacille de l'ozène ne s'y développe guère d'une façon perceptible, et ne change pas la nature du milieu. Le pneumo-bacille, au contraire, y prospère très bien, dégage parfois des gaz et fait coaguler le lait en l'acidifiant. Il est bon de noter que la coagulation n'a lieu quelquefois qu'au bout d'un certain temps ;

3° *J'ai trouvé des différences capitales quant aux* ODEURS *produites par les cultures respectives des deux microorganismes. Ensemencé sur de la gélose, le pneumobacille dégage toujours (fait que je n'ai trouvé mentionné nulle part), une forte odeur de triméthylamine*, et rend alcalin le milieu de culture, s'il ne l'était pas déjà auparavant.

Il produit, d'ailleurs, selon mes recherches, cette senteur partout où l'air trouve un accès facile, par exemple dans toutes les cultures étalées en surface et dans les plaques de gélatine. On la constate également sur les piqûres dans cette substance lorsqu'elles sont un peu vieilles. Les plaques dégagent, après un certain temps, une odeur de vieux fromage. Dans le bouillon peptonisé, on trouve l'odeur de la triméthylamine.

Il n'y a que sur la pomme de terre que le pneumobacille donne une senteur plutôt agréable, qui ressemble beaucoup à celle produite sur la même substance par le microbe de l'ozène. Quelquefois, cependant, j'ai trouvé aussi à ces cultures un mélange d'une senteur désagréable d'acide butyrique.

Sur les autres milieux le pneumobacille donne toujours des odeurs déplaisantes, contrairement à son sosie de l'ozène qui en produit d'agréables, comme nous l'avons vu. Ce n'est que sur de la *viande fraîche* ou stérilisée par la chaleur, qu'ils donnent, l'un et l'autre, de très mauvaises odeurs, mais, là encore, elles sont différentes : tandis que le pneumobacille y produit une senteur de putréfaction et de triméthylamine, le cocco-bacille de l'ozène donne une odeur de putréfaction également, mais différente de l'autre et un peu ammoniacale.

Nous constatons donc, en résumé, que si les deux microbes, examinés au microscope, présentent de grandes ressemblances, ils montrent, néanmoins, de remarquables différences quant à certains détails d'aspect de leurs cultures, aux odeurs qu'elles dégagent et à leur action sur le lait.

Nous verrons, d'ailleurs, dans la seconde partie de ce travail, des preuves expérimentales beaucoup plus concluantes encore de la non-identité des deux microbes.

Il faut rappeler ici qu'on considère également comme un pneumobacille atténué un microorganisme trouvé dans une maladie rare et bien curieuse des fosses nasales, le *Rhinosclérome*. Dans cette affection, qu'on n'observe pas dans l'ouest de l'Europe, M. von Frisch, le premier, a décrit, en 1882, un bacille que plusieurs savants [1], entre autres M. Netter, déclarent identique à celui de Friedlaender. Or, le rhinosclérome provoque, dans

1. GÜNTHER (*Einführung in das Studium der Bakteriologie*, p. 204) dit : « Le rhinobacille » (c'est-à-dire le microbe du rhinosclérome) ne se distingue en aucune façon du pneumobacille, si ce n'est que sa virulence semble un peu moindre.

los fosses nasales, des lésions pour ainsi dire diamétralement opposées à celles que l'ozène y engendre.

Dans la première de ces deux affections, la membrane de Schneider et, plus tard, même, le squelette du nez, présentent un épaississement des plus considérables, pouvant amener l'obstruction complète des fosses nasales, comme également du larynx.

Dans l'ozène, au contraire, il y a atrophie de la muqueuse et même de certains os du nez et, par suite, élargissement caractéristique de son intérieur. Par conséquent, et malgré toutes les ressemblances que les auteurs ont trouvées entre le bacille du rhinosclérome et le pneumobacille d'une part, et, d'autre part, entre ce dernier et celui de l'ozène, il me semble impossible d'admettre que des lésions aussi parfaitement opposées que celles dues à ces deux affections (hypertrophie dans l'une, atrophie dans l'autre) puissent être provoquées par le même microbe.

Ce doute est puissamment fortifié par le fait que *le bacille du rhinosclérome se colore par le procédé de Gram*, tandis que les deux autres ne se colorent pas.

Autres microbes trouvés dans l'ozène. — Parmi les autres travaux publiés sur l'ozène, je passe sous silence ceux qui se sont contentés d'affirmations ou de négations théoriques, et j'arrive à un important mémoire de M. Hajek[1], dont les principales conclusions (erronées, selon moi) ont passé dans tous les livres. *L'auteur confirme d'abord*, comme M. Thost, *la présence constante dans l'ozène d'un microbe identique au mien*, qu'il croit, d'ailleurs, lui aussi, être celui de Friedlaender, mais il n'admet pas de relation de cause à effet entre lui et la maladie.

Il décrit ensuite un bacille court qu'il a trouvé dans sept cas d'ozène sur dix étudiés par lui bactériologiquement. D'après lui, ce microbe, extrêmement mobile, liquéfie très rapidement la gélatine, et lui donne, ainsi qu'à d'autres milieux de culture, une odeur extrêmement semblable à celle de l'ozène. Injecté sous la peau d'un lapin, il détermine une inflammation d'une violence extraordinaire qui amène rapidement la gangrène.

M. Hajek pense que ce bacille liquéfiant, qu'il appelle *Bacillus foetidus ozaenae*, est très probablement la cause de l'odeur *sui generis*. Je crois que *M. Hajek a fait erreur et a pris un hôte acci-*

1. M. Hajek, Die Bakterien bei der acuten und chronischen Coryza, sowie bei der Ozaena und deren Beziehungen zu den genannten Krankheiten (in *Berliner klinische Wochenschrift*, 13 août 1888).

dentel des fosses nasales pour le microbe propre à cette maladie. Je passe rapidement sur le fait qu'il ne l'a trouvé que sept fois sur dix cas examinés. Pour moi, sur les centaines de plaques que j'ai faites avec de la gélatine ensemencée de mucus ozénique, je n'ai rencontré des microbes liquéfiants que rarement, et encore là où il s'en trouvait, le nombre de leurs colonies était insignifiant. J'ai même été surpris de cette rareté, et on peut se demander si le mucus nasal n'entraverait pas particulièrement les qualités vitales des microbes *liquéfiants* [1] ?

Un autre travail important sur la bactériologie de l'ozène a été publié ensuite par M. *Marano* [2]. L'auteur y dépeint le microbe particulier d'une façon absolument conforme à ce que j'en avais dit. Quant à la capsule, il croit qu'elle m'a échappé.

M. Marano a remarqué comme moi l'existence de deux sortes de colonies, les unes petites et jaunes, les autres grandes et blanchâtres, mais sans reconnaître que ces différences d'aspect dépendent uniquement de la place superficielle ou profonde occupée sur la gélatine. D'autres espèces que le cocco-bacille de l'ozène, le pneumobacille par exemple, ou même diverses levures, présentent la même particularité, et, dans une culture en piqûre sur la gélatine, le même tube montre, tant avec le cocco-bacille de l'ozène qu'avec le pneumobacille, des colonies blanches et copieuses à la surface (clou) et des colonies plus petites et jaunes dans la profondeur.

M. Marano pense que les deux espèces de colonies sont formées par des organismes différents, et il appuie son opinion sur la diversité des formes observées au microscope dans les deux groupes. Mais on sait que les cultures pures d'un même microorganisme (surtout quand elles sont un peu anciennes) présentent parfois des formes très variées. Tel est le cas pour notre microbe qui montre, selon la nature du milieu ou l'ancienneté de la culture, des formes ressemblant tantôt à des coccus, tantôt à des bacilles, en passant par toutes les configurations intermédiaires.

1. Les cultures sur gélatine sont souvent compromises par des mucédinées liquéfiantes. J'arrive à me débarrasser de ces hôtes incommodes en les touchant avec la pointe d'un galvano-cautère ou plus simplement avec un fil de platine rougi.

2. SALVATORE MARANO, Sulla natura dell'ozena (Studii storici et batteriologici). In : *Archivii italiani di Laringologia*, Janvier 1890.

L'auteur italien ajoute encore que les colonies jaunâtres liquéfient rapidement la gélatine. C'est un point sur lequel je ne suis pas d'accord avec lui. Les colonies jaunes possédant cette propriété étaient certainement des impuretés.

Les derniers travaux en date que je connaisse sur la bactériologie de l'ozène sont dus à M. *Strazza* et à M. *Laurent*. Le premier, que je connais seulement par un résumé assez succinct [1], annonce que le microbe est pathogène pour les cobayes. Le résumé du mémoire de M. Laurent [2] ne contient aucun fait nouveau.

II

EXPÉRIENCES SUR LES ANIMAUX

1° *Propriétés pathogènes du microbe de l'ozène.* — J'ai exposé dans mon premier mémoire (1884) et dans les pages précédentes du présent travail, les caractères du cocco-bacille de l'ozène qui prouvent déjà, à mon avis, qu'il constitue réellement un microbe *sui generis*. Cette démonstration trouvera une confirmation nouvelle et encore plus décisive dans les résultats des expériences qui vont être exposées maintenant. Elles ont trait à l'action de ce cocco-bacille sur les animaux, et ont été instituées surtout dans le but de vérifier s'il est pathogène ou non pour eux.

Les cultures sur gélose étant plus virulentes que sur gélatine ou dans le bouillon, c'est d'elles que je me suis servi. Mes inoculations ont toujours été faites, sauf mention du contraire, avec l'enduit d'une culture de vingt-quatre heures sur gélose à 37°,5, délayé dans 3 c. c. de bouillon peptonisé et stérilisé. Cette émulsion du microbe de l'ozène est éminemment pathogène.

Inoculée à des *souris*, blanches [3] ou grises, par la voie hypodermique, elle les tue, même à la dose d'un vingtième de centimètre cube. La mort arrive quelquefois en moins de vingt heures.

1. Dr Strazza, Osservazioni bacteriologici sull'ozena, in : *Atti del primo congresso della Societa italiana di Laringologia, etc.*, Florence, 1892, p. 202 et 203.
2. Dr Laurent, La bactériologie de l'ozène, in : *Compte rendu de la Société belge d'Otologie, etc.* (4 juin 1893), donné par la *Revue de Laryngologie, etc.*, 1893, p. 574 et 575.
3. Lorsqu'il ne sera pas fait de mention spéciale dans la suite, il s'agira toujours de souris *blanches*.

A plus faible dose, ou quand on emploie une culture déjà vieille, les animaux pourront ne succomber que le lendemain ou même plus tard. Mais, en définitive, aucune des trente et une souris ainsi traitées n'a survécu (à l'exception d'une seule, le n° 22, sur laquelle nous reviendrons plus loin).

Après l'inoculation, les souris perdent vite leur agilité caractéristique; la respiration s'accélère, et le poil se hérisse. Généralement, les animaux tiennent un œil ou les deux fermés. Les bords de la fente palpébrale sont souvent chassieux, mais la cornée reste claire. Les matières purulentes de l'œil ne m'ont pas donné le microbe de l'ozène en culture, dans le seul cas que j'ai examiné sous ce rapport[1]. L'appétit semble persister, parfois jusqu'à la fin.

L'autopsie ne révèle quelquefois aucune lésion particulière; d'autres fois elle montre un gonflement du foie et de la rate. A l'endroit de l'injection, on constate souvent une infiltration pénétrant plus ou moins profondément dans les parties sous-jacentes. Les poumons n'offrent pas d'altération macroscopique; ils sont d'un beau rose et surnagent sur l'eau; donc, pas de pneumonie! Ce résultat offre un certain intérêt, quand on considère le rôle souvent attribué, dans la genèse de cette affection, au pneumobacille, que presque tous les auteurs identifient avec le microbe de l'ozène.

Une seule souris a présenté de l'ascite et un épanchement dans la plèvre. Les ensemencements faits avec ces deux liquides ont donné le microbe de l'ozène à l'état de pureté.

Chez toutes ces souris, le sang pris dans le cœur avec les précautions habituelles montrait une quantité innombrable de magnifiques cocco-bacilles entourés de leurs capsules, et donnait invariablement des cultures pures, caractéristiques et abondantes, du microbe de l'ozène.

Par contre, je puis affirmer, d'après les coupes que j'ai faites des poumons, du foie et du cœur de ces animaux, que les microbes ne se trouvent pas dans les tissus des organes en dehors des voies sanguines.

1. Chez plusieurs personnes atteintes d'ozène et de *maladies des yeux*, surtout de kératites, qui m'ont été adressées par des oculistes de mes amis pour rechercher le cocco-bacille de la punaisie dans le liquide du sac conjonctival, je n'ai jamais pu l'y constater.

Les cobayes résistent à l'inoculation sous-cutanée du microbe, mais succombent sans exception à son injection dans la cavité abdominale, à la suite de laquelle ils meurent le lendemain ou le surlendemain. Même ceux qui ont supporté l'introduction préalable de ce microorganisme sous la peau ne sont aucunement vaccinés de ce fait, mais succombent, après l'injection d'une culture suffisamment fraîche dans la cavité abdominale, aussi vite que les animaux témoins.

Voici, pour démontrer l'action du microbe sur les cochons d'Inde, l'histoire de quelques-uns des animaux ainsi inoculés :

Un cobaye avait d'abord reçu sous la peau une culture entière du coccobacille et supporta ensuite l'injection, dans l'abdomen, d'une petite quantité d'une culture affaiblie, vieille de 51 jours, et qui avait, par conséquent, perdu beaucoup de sa virulence. Deux mois et demi après, il reçut, dans la même cavité, une plus grande quantité de virus encore plus ancien, c'est-à-dire la moitié d'une culture vieille de 68 jours. Il fut néanmoins malade le lendemain et mourut le troisième jour.

A l'autopsie, on trouve, chez les cobayes tués de cette façon, une péritonite généralisée, souvent des fausses membranes sur telle ou telle partie du péritoine, par exemple sur la face convexe du foie, et de l'ascite avec liquide abondant, louche et souvent rempli de grumeaux. Tous ces exsudats donnent des cultures pures du bacille.

Un autre cochon d'Inde avait d'abord subi l'inoculation d'une culture du microbe de l'ozène sous la peau du dos. Il résista ensuite également à l'injection, dans l'abdomen, d'une culture vieille de 30 jours, très-affaiblie certainement, car elle avait été inoculée également à la souris n° 21 et à un lapin, sans les tuer (v. plus loin pour ces deux animaux). Il reçut ensuite le 26 juin, dans la cavité péritonéale, une portion d'une culture rajeunie de la veille sur gélose, et provenant du sang du cœur d'un autre cobaye qui avait succombé à l'injection du microbe de l'ozène. (Le reste du tube fut injecté aux deux animaux sus-mentionnés). Il fut souffrant le lendemain et avait le poil hérissé, mais il mangeait. Je le trouvai mort le 27 juin au matin.

A l'autopsie de ce cochon d'Inde, on trouva d'abord les lésions ordinaires dues à la péritonite et une ascite avec liquide abondant. En outre, le côté externe du testicule droit était occupé par une masse jaunâtre, d'apparence compacte. L'organe fut sectionné avec les précautions ordinaires, et des cultures furent faites avec la masse jaune. Elles donnèrent le microbe de l'ozène à l'état de pureté, et en plus grande abondance même que celles du sang qui contenaient fort peu de cocco-bacilles. Malheureusement la pièce a été jetée avec le corps du cobaye, avant que son examen microscopique ait pu être pratiqué. Il m'a cependant semblé qu'il s'agissait là simplement d'une infiltration partielle du testicule par les microbes, due peut-être à une piqûre de cet organe par l'aiguille de la seringue.

D'autres cobayes ayant péri avec les mêmes symptômes que le premier, à la suite des inoculations ozéniques, il est inutile d'ajouter la description des autres expériences faites sur ces animaux.

Lapins. — Un vigoureux lapin pesant 1,690 gr. reçut le 10 avril, dans la veine auriculaire, un tiers d'une culture sur gélose, vieille de 10 jours et délayée dans 3 c. c. de bouillon stérilisé. (La culture provenait du cœur d'une souris ayant succombé à une inoculation avec le microbe de l'ozène, et tuait, à la dose d'une division de la seringue de Pravaz du susdit mélange, en 26 heures, une autre souris pesant 16 grammes). Le lendemain de l'injection, le lapin fut trouvé mort. Le sang pris dans le cœur contenait peu de cocco-bacilles, mais donnait de belles cultures pures du bacille de l'ozène, qui s'y montra encapsulé comme dans tous ces cas.

Un autre lapin (nº 2) reçut le 30 mai, sous la peau du ventre, l'injection d'une culture faite le 11 avril avec le sang du précédent. Il se forma, à l'endroit de la piqûre, un énorme abcès, long de 10 cent. environ, qui suppura pendant des mois. Le pus de cet abcès donna le microbe de l'ozène et des staphylocoques. Le 8 juin, la suppuration continuant, j'injectai dans la cavité abdominale du lapin une petite quantité d'une culture sur gélose provenant du cœur d'une souris tuée par le microbe de l'ozène. La culture était vieille de deux mois. Survie. Le 12 du même mois, le lapin reçut, dans l'abdomen, un demi-centimètre cube d'une culture du sang d'une souris tuée par le même microorganisme, culture vieille de 36 jours. Survie également. Le 16 juin, l'abcès commençait enfin à se cicatriser sous un pansement phéniqué. Un œil était congestionné et suppurait; il fut soumis à des lavages avec une solution d'acide phénique à 1,5 0/0. Le 25 juin, l'abcès se trouvait guéri, et le lapin, dont le poids était descendu à 1,410 grammes, en pesait alors 1,825.

Le 26 juin, il reçut, dans l'abdomen, un centimètre cube, cette fois, *d'une culture fraîche* (datant du 22 juin). Elle provenait du foie d'une souris tuée par le microbe de l'ozène, et sa pureté était sûre, car elle avait été faite avec une colonie isolée d'une plaque de gélatine. Des portions de la même culture furent injectées à trois autres animaux : 1° au cobaye nº 4 qui en mourut en moins de 20 heures; 2° à une souris témoin qui succomba le quatrième jour, et 3° à la souris (nº 22) vaccinée contre le microbe de l'ozène (v. plus loin), qui survécut en vertu de l'immunité acquise. Le lapin ayant résisté à l'injection d'une forte dose de ce produit extrêmement virulent pouvait donc être considéré, à juste titre, comme vacciné contre le cocco-bacille ozénique, et son immunité a été utilisée, ainsi qu'on le verra tout à l'heure.

Plusieurs autres lapins inoculés, soit dans la veine auriculaire, soit dans la cavité abdominale, ont tous succombé, à l'exception d'un seul, qui a résisté à une injection intraabdominale. Chez ceux tués par l'injection intraveineuse, l'autopsie

montre des hémorrhagies dans le péritoine et dans le parenchyme de presque tous les organes, surtout du poumon et de la rate. Celle-ci et les reins sont gros. Le mésentère montre quelquefois des ganglions tuméfiés. Le sang renferme un nombre variable de cocco-bacilles encapsulés. Il donne, bien entendu, de belles cultures pures.

TOXINES ET VACCINATION

J'ai déjà effleuré dans le chapitre précédent la question de la vaccination qui m'a conduit à l'étude des toxines. J'ai procédé de la façon suivante : Une culture pure du microbe dans du bouillon peptonisé fut faite le 17 avril avec le sang du cœur d'une souris tuée par ce microorganisme. Le lendemain, 18 avril, j'injectai 1/2 c. c. de ce bouillon sous la peau d'une souris grise pesant 13 grammes. Bien portante encore le 19, je la trouvai morte le 20 au matin. Cette culture virulente fut alors chauffée, dans des tubes scellés, pendant une heure à 58°. L'expérience montra qu'elle était devenue stérile; elle fut alors injectée, en proportions diverses, à des souris : une première, pesant 13 grammes, en reçut 1/2 c. c. et mourut le quatrième jour. *Son sang ne contenait aucun microbe et ne donnait pas de cultures. La mort ne pouvait donc être due qu'aux toxines élaborées par le cocco-bacille.* Une autre souris (n° 20), pesant 16 grammes, reçut 13 divisions de la seringue. Mais elle avait été inoculée précédemment avec des portions de différentes cultures chauffées à des températures plus élevées que 58° (100°, 72°, etc.) et les avait bien supportées. Elle survécut aussi à la dernière injection faite avec du bouillon de culture porté à 58° seulement.

Dans le but d'examiner si ces diverses inoculations avaient conféré à la souris en question *l'immunité* contre le microbe de l'ozène, je lui injectai, six jours après, une portion d'une culture, vieille de deux mois, qui provenait du sang d'une autre souris tuée par le même microorganisme. Une autre (témoin), pesant 18 grammes, fut inoculée avec une quantité, proportionnelle à son poids, de la même culture. Le lendemain, ce témoin avait la respiration précipitée et les paupières collées. L'autre souris fut prise à son tour un peu plus tard, et mourut le 4 juin, tandis

que le témoin succomba le 3. La tolérance à la toxine ne s'accompagnait donc d'aucune immunité sensible vis-à-vis du microbe[1].

On peut pourtant vacciner avec des cultures chauffées contre l'inoculation d'une culture non chauffée. J'ai réussi à cela avec une seule de mes souris, le n° 22, pesant 20 grammes, et qui a supporté une première injection de 1 c. c. d'émulsion de culture chauffée, puis, peu de temps après, une seconde.

Je continuai alors l'expérience, en lui inoculant des cultures *non chauffées* et de plus en plus fraîches, c'est-à-dire de plus en plus actives. Comme suites, il n'y eut que des abcès sous-cutanés aux lieux d'injection.

Le 26 juin, elle reçut enfin une *grande quantité* d'une culture fraîche qui, injectée dans l'abdomen d'un cobaye, n° 4, l'avait tué en moins de vingt heures, de même qu'elle avait été fatale à une souris-témoin (v. plus haut). A la suite de l'inoculation de ce produit extrêmement virulent, il se développa un abcès énorme sur le dos de la souris, à l'endroit de l'injection, et la peau se décolla sur une grande étendue, de façon à laisser à nu une cavité vaste et profonde. Enfin, un grand lambeau cutané, formant comme un couvercle qui avait adhéré longtemps par une petite bride, tomba par suite de sphacèle. La souris fut très-malade et eut l'œil gauche fermé et le poil hérissé. Mais, finalement, l'abcès se ferma, en végétant copieusement, et, vers le milieu de juillet, la souris était tout à fait rétablie.

Elle avait donc résisté à l'injection d'une grande quantité d'une culture des plus virulentes, et possédait alors, par conséquent, l'immunité contre le microbe de l'ozène, fait d'autant plus remarquable que les souris, comme nous l'avons vu plus haut, sont extrêmement sensibles à l'inoculation de ce microbe, dont les plus petites quantités les tuent. En raison de ce dernier fait, juste-

1. Il n'en reste pas moins acquis que les cultures du microbe de l'ozène contiennent une toxine, et, si celle-ci agit sur l'homme comme sur les souris, on est autorisé à attribuer, comme je le faisais en 1884 dans mon opuscule cité, « la santé débile, l'aspect malsain et le teint blafard des ozéneux, non seulement à l'aspiration incessante des produits gazeux que révèle la puanteur de l'haleine, mais aussi à la déglutition des produits non gazeux, parmi lesquels il y en a certainement de fort nuisibles. Ce fait est certain pour moi, depuis que j'ai constaté la présence du cocco-bacille dans les mucosités qui revêtent la paroi postérieure du pharynx, et qui sont certainement avalées de temps en temps » (*Loc. cit.*, p. 12). Il serait intéressant de chercher s'il y a de ce fait des troubles gastriques chez les ozéneux.

ment, j'incline à penser que c'est l'injection des toxines d'abord et des cultures affaiblies ensuite qui a conféré l'immunité à cette souris.

Le lapin n° 2 avait également pu être vacciné contre le microbe de l'ozène.

L'immunité ayant été obtenue chez ces deux animaux, il était intéressant de rechercher si leur sérum pourrait conférer l'immunité contre le microbe de l'ozène. Comme il n'était pas possible de tirer du sang, en quantité suffisante, de la souris, je m'adressai pour cela au lapin vacciné qui supporta parfaitement, le 13 décembre, une abondante saignée à la carotide.

Nourri depuis longtemps au laboratoire, ce lapin était énorme; tandis que son poids primitif avait été de 1 kilog. 600 gr. environ, il pesait vers l'époque que je viens de mentionner, 3 kilog. 215 gr. Le sérum de son sang fut employé de la manière suivante : une souris neuve fut inoculée avec le microbe de l'ozène et, après sa mort, deux tubes de gélose furent ensemencés avec son sang. Les cultures ayant bien pris le lendemain, 27 décembre, l'une d'elles (surface râclée) fut injectée, moitié dans la cavité abdominale d'un lapin, moitié dans la veine auriculaire d'un autre. Celui-ci fut trouvé mort le 29 au matin, l'autre déjà le 28 à la première heure. L'extrême virulence de ces cultures étant ainsi prouvée, j'injectai, le 29, un c. c., équivalent à un tiers du second tube, dans la veine auriculaire d'un vigoureux lapin, et immédiatement après, dans la veine de l'autre oreille, 2 c. c. du sérum du lapin vacciné. L'animal inoculé fut assez abattu le lendemain et ne mangea point : il avait une température rectale de 41°,1 : mais le surlendemain il se portait mieux, mangea et n'avait plus que 40°,3. Trois jours après, sa température était de 39°,9. Actuellement, il est complètement rétabli. *L'injection du sérum du lapin immunisé contre le microbe de l'ozène avait donc combattu victorieusement celle d'une culture extrêmement virulente du même microorganisme.*

Dans le but de déterminer la durée de cette immunité chez le lapin vacciné, et la persistance de la propriété immunisante dans le sérum qu'on lui avait tiré, j'ai institué de nouvelles expériences.

Le 14 janvier, une culture fut faite sur gélose, avec une autre ensemencée avec le sang du lapin n° 8, lequel avait succombé le 27 décembre à l'injection intraveineuse du microbe de

l'ozène. La culture fut injectée en entier le 13 janvier dans la veine auriculaire du lapin n° 2 qui avait non seulement été immunisé, mais dont le sérum avait même protégé d'autres animaux contre l'inoculation du même cocco-bacille. Je le trouvai mort le lendemain matin; *l'immunité avait donc de nouveau disparu*, quatorze jours après l'époque où elle avait été constatée : quant au sérum de son sang tiré le 13 décembre, sérum qui vaccinait encore le 29 du même mois (voir plus haut), il en fut injecté le 16 janvier de l'année suivante quatre divisions de la seringue, mélangées avec deux divisions d'une culture faite avec le sang du lapin n° 5, à une souris noire pesant 11 gr. Elle fut trouvée morte le surlendemain matin. *Le sérum avait donc perdu l'effet immunisant qu'il possédait encore dix-huit jours auparavant.*

Après la mort du lapin n° 2 (l'ex-immunisé), plusieurs pipettes de sang lui furent tirées du cœur. Le sérum de l'une fut injecté le 17 janvier à une souris grise pesant 13 grammes et la tua en quatre jours. Le sang de la souris était riche en cocco-bacilles et donnait de belles cultures pures.

Les faits qui précèdent nous apprennent donc que l'immunité que j'avais réussi à conférer au lapin n° 2 avait disparu au bout d'un certain temps, comme également la propriété vaccinante du sérum du sang tiré à cet animal et conservé à la température ordinaire.

Nous pouvons maintenant revenir, par une autre voie, à la question de l'identité entre le pneumobacille et le microbe de l'ozène. Nous avons fait valoir, contre cette identité, des différences dans l'aspect et certaines propriétés des cultures. Mais nous avons maintenant un autre moyen d'épreuve, c'est de voir si l'immunité contre l'un de ces microbes implique l'immunité contre l'autre, et réciproquement.

La virulence du pneumobacille n'ayant guère été éprouvée jusqu'ici que par des injections massives dans le poumon au travers de la paroi thoracique [1], injections faites pour étudier ses relations avec la production de la pneumonie, j'ai dû, mon objet étant autre, choisir une autre méthode d'expérimentation. J'ai opéré chez la souris par voie hypodermique, en profitant de ce que le tissu sous-cutané, très lâche sous la peau du dos,

1. Voir à ce sujet C. Fraenkel, *Grundriss d. Bakterienkunde*, 3e édition, 1893, pages 413 et 277.

permet d'introduire en ce point, sans occasionner une plaie sérieuse, des quantités relativement énormes de liquide.

En inoculant ainsi des cultures anciennes, on obtient assez facilement des souris qui survivent, mais qui ne sont pas vaccinées contre l'inoculation de cultures rajeunies sur gélose. Ainsi une de ces souris (nº 14), qui avait supporté l'injection d'une vieille culture, fut inoculée en même temps qu'une souris témoin, avec une culture du pneumobacille sur gélose datant de la veille. Le témoin nº 15 survécut, alors que la souris qu'on aurait pu croire vaccinée mourait en 40 heures.

Le 17 avril, expérience analogue : deux souris furent inoculées, le témoin nº 15 de l'expérience précédente, et une souris neuve, témoin nº 16. Elles reçurent chacune *une grande quantité d'une culture fraîche* provenant du sang pris dans le cœur du nº 14, culture nécessairement très active par sa fraîcheur et par le fait du passage du microbe par le corps d'un animal. L'inoculation, faite un peu brutalement, causa de grands délabrements à la souris nº 15. Aussi, immédiatement après, était-elle dans un grand état de prostration, tenant les yeux fermés. Mais, le 18 avril, elle était complètement rétablie, et résista finalement à cette nouvelle et grave inoculation. *Cette souris possédait donc l'immunité contre le pneumobacille.* Par contre, le nº 16 (témoin) mourut le 25 avril. Elle portait au ventre une énorme escharre à laquelle adhérait l'intestin grêle.

Possédant maintenant une souris qui présentait l'immunité contre le bacille de Friedlaender, je profitai de l'occasion pour examiner si cette propriété implique l'immunité à l'égard du microbe de l'ozène. A cet effet, je lui injectai, le 27 avril, six divisions d'une culture de ce dernier microorganisme (provenant du sang de la souris nº 17, qui avait été tuée en deux jours par une injection du même cocco-bacille cultivé dans du bouillon). Le lendemain, je la trouvai morte; *l'immunité contre le pneumobacille ne l'avait donc pas protégée contre le microbe de l'ozène.*

On ne peut donc croire à l'identité des deux microbes, ni penser que le microbe de l'ozène est un pneumobacille atténué. Mais il reste une hypothèse que personne, il est vrai, n'a encore faite, c'est que le microbe de l'ozène serait au contraire un pneumobacille exalté. Pour l'examen de cette hypothèse, il fallait retourner l'expérience qui précède, et rechercher si un

animal vacciné contre le bacille de l'ozène résisterait au bacille de Friedlaender.

La sensibilité des souris vis-à-vis du cocco-bacille est telle qu'il ne semblait pas facile de leur conférer l'immunité à son égard.

J'y suis cependant parvenu chez la souris nº 22, ainsi que je l'ai déjà dit incidemment plus haut. Le 14 juillet, lorsque l'abcès du dos était cicatrisé, j'injectai à cette souris la moitié de la seringue de Pravaz d'une culture fraîche de pneumobacille, qui provenait du sang d'une autre souris (nº 16) tuée par l'inoculation de ce microbe. Un autre témoin (nº 26) reçut l'autre moitié du contenu de la seringue. Le lendemain, toutes les deux étaient somnolentes. Le témoin eut la respiration précipitée, l'autre était calme. Le 17 juillet, le témoin eut l'œil gauche fermé et chassieux. Le 21 du même mois, les *yeux du nº 22 (l'ancienne) étaient clos, et le lendemain je la trouvai morte.* L'autre souris (nº 26) vivait encore le 3 août; ses yeux étaient clairs, mais la dyspnée continuait. J'ai appris, à mon retour des vacances, que cette souris a succombé le 7 septembre. Je n'ai pu avoir aucun détail sur la cause de sa mort.

L'autopsie de la souris nº 22 (vaccinée contre le microbe de l'ozène), montra, comme c'est la règle chez les animaux tués par celui-ci ou par le pneumobacille, les poumons sains, d'un beau rose et surnageant sur l'eau. Les préparations microscopiques et les cultures du sang montraient le cocco-bacille de Friedlaender en abondance. A la peau du ventre on voyait plusieurs escharres assez étendues.

La vaccination contre le microbe de l'ozène n'avait donc pas protégé la souris contre celui de Friedlaender; nouvelle preuve de la non-identité de ces deux microbes [1].

CONCLUSIONS

Les expériences décrites dans les derniers chapitres nous autorisent à formuler les conclusions suivantes :

1º *Le microbe de l'ozène n'est pas identique au pneumobacille, dont il ne constitue ni une forme atténuée ni exaltée.*

2º *Le cocco-bacille de l'ozène que j'ai décrit en 1884 est un microbe*

1. Je me vois obligé de me borner à cette expérience unique, n'ayant réussi à conférer qu'à une seule souris l'immunité contre le microbe de l'ozène.

sui generis *et propre à l'affection en question*. Il se trouve, dans tous les cas de cette maladie, en masses énormes et la plupart du temps sans qu'une autre espèce soit présente [1]. Enfin ce microbe n'a encore été rencontré que chez les ozéneux; sa présence constante dans une maladie aussi nettement caractérisée quant à ses lésions et à l'odeur qu'elle produit — et dans cette maladie seule — démontre, à mon sens, que celle-ci et le microbe s'impliquent mutuellement.

Il est vrai que je n'ai pas réussi à reproduire dans mes cultures l'odeur caractéristique de l'ozène, mais j'ai discuté plus haut cette objection. Il y a à ce sujet un nouveau progrès à réaliser, et les faits acquis n'en restent pas moins acquis.

Il est vrai aussi que je n'ai pas réussi à reproduire l'ozène sur des animaux par l'introduction de mes cultures dans le nez; mais ce reproche s'applique à tant de travaux de microbiologie que ce n'est plus la peine de le soumettre à une discussion.

3° *Le microbe de l'ozène est extrêmement pathogène*. La découverte de son existence n'apprend donc pas seulement un fait bactériologique nouveau, mais révèle en outre la présence, dans le corps des ozéneux, d'un être capable d'exercer une action redoutable, sous condition que l'entrée des vaisseaux sanguins ou lymphatiques lui soit ouverte. Non seulement la surface interne des fosses nasales, encore agrandie par celle des cornets, le loge en masses innombrables, mais il déborde jusque dans les cavités adjacentes, par exemple, le pharynx nasal et, dans certains cas, même le larynx.

Toute blessure de la muqueuse pourrait donc lui créer une porte d'entrée. Ce danger possible nous impose l'obligation d'éviter, dans le traitement de l'ozène, toute manipulation capable de blesser la muqueuse et d'ouvrir ainsi au microbe les voies lymphatiques ou sanguines, surtout les veines qui sont extrêmement serrées, particulièrement au cornet nasal inférieur, où elles forment comme un tissu caverneux.

4° Comme *conclusion accessoire*, j'ajouterai que, si le microbe de l'ozène est toujours pathogène, le pneumobacille, tout en présentant une certaine variabilité à cet égard, n'en possède

1. Je viens de découvrir, dans un cas d'ozène, la présence constante de grandes masses d'un *vibrion* à côté du cocco-bacille spécial. Je me réserve de revenir sur cette curieuse association, dès que j'aurai terminé l'étude du vibrion en question.

pas moins une sérieuse puissance pathogène pour les souris.

Appendice. — Sur le point de terminer ce mémoire, j'ai eu connaissance d'un excellent travail publié par M. Abel dans le *Centralblatt f. Bakteriologie, etc.*[1], dont les résultats concordent en général avec les miens, et qui, tout en confirmant la description déjà ancienne du microbe que j'ai découvert dans l'ozène, m'a donné connaissance des résultats de M. Ch. Hope, de Campos Sales, Valentin, Berliner et Reimann. Tous ces savants, à l'exception du dernier, confirment l'existence du cocco-bacille, mais diffèrent d'opinion sur son rôle. M. Abel seul partage complètement mon opinion, et le regarde comme caractéristique de l'ozène [2].

Il l'a vu prépondérant dans tous les cas de la maladie; mais tandis que je l'ai rencontré *pur* dans la très grande majorité de mes nombreuses cultures sur plaques, il ne l'a trouvé seul présent que dans quatre cas sur seize. Par contre, il ne l'a jamais vu dans le mucus de vingt nez sains ou atteints d'autres affections que l'ozène. Pour lui, la capsule n'existe pas toujours [3].

Il n'insiste guère sur les odeurs de la culture sur divers milieux. Il dit seulement, à ce sujet: « le bacille donne sur tous les milieux une odeur particulière, difficile à définir, et ressemblant peut-être le plus à celle du malt en fermentation ». Il a vu quelques gaz se dégager dans les cultures sur gélose et sur gélatine, mais jamais sur la pomme de terre. Je n'ai constaté ce fait sur aucun de ces milieux de culture.

Les résultats de mes inoculations aux souris et aux cobayes concordent avec les siens jusque dans dans le nombre des jours de survie de ces animaux. M. Abel ajoute, ensuite, que dans le sang des animaux tués par l'inoculation du microbe de l'ozène, ce cocco-bacille ne se montre pas trop souvent encapsulé; cela est en contradiction absolue avec mes nombreuses observations, qui me l'ont pour ainsi dire toujours montré encapsulé dans le sang. *M. Abel affirme en outre que le lapin résiste à toute inoculation de l'ozène.* A une seule exception près, tous les lapins aux-

1. Bakteriologische Studien ueber Ozaena simplex, l. c. XIII, p. 161-173.

2. Comme sa description concorde avec la mienne datant de 1884, je ne vois pas bien pourquoi M. Abel lui donne le nom nouveau de *Bacillus mucosus ozaenae*.

3. Je dirai en passant que M. Abel, le premier, a reconnu ma priorité quant à la découverte de cette capsule.

quels je l'ai injecté, en sont, au contraire, morts, et cela dans des délais quelquefois très courts.

L'auteur dit ensuite que « les souris succombent toujours au microbe de l'ozène, et non pas à celui de Friedlaender, fait signalé aussi par Pfeiffer ». Or, mes expériences, relatées dans un des chapitres précédents, contredisent absolument l'affirmation de ces deux auteurs, quant à l'innocuité présumée du pneumobacille pour les souris.

M. Abel affirme ensuite que l'odeur causée par l'ozène ne diffère pas de celles dues à d'autres affections intranasales, par exemple des processus syphilitiques. Nous avons vu plus haut que la nécrose par syphilis tertiaire du nez, par exemple, exhale un foetor tout à fait différent de celui de l'ozène vrai. Il est à supposer que l'auteur, qui n'est pas spécialiste, que je sache, ne possède pas d'expérience suffisante sur ce terrain, réservé plutôt au rhinologiste.

Enfin, en discutant la question de la contagiosité de l'ozène, M. Abel dit textuellement ceci : « Je n'ai pas trouvé l'occasion d'essayer l'inoculation du bacille à l'homme. »

Je ne pense pas que l'on ait le droit de faire de telles expériences : mais peut-être pourrait-on le tenter dans un but thérapeutique, et essayer de combattre par l'ozène, affection, certes, des plus fâcheuses, mais non dangereuse, une maladie comme le *rhinosclérome*, qui peut devenir mortelle, car l'épaississement caractéristique pour cette affection ne se borne pas à la peau et à la muqueuse du vestibule des fosses nasales et de la lèvre supérieure, mais peut obstruer les orifices antérieur et postérieur du nez, et surtout le larynx, et amener de cette façon la mort par suffocation.

Or, si le rhinosclérome est une maladie hypertrophiante, l'ozène est essentiellement atrophiant, et les deux affections sont carctérisées par des bacilles qui présentent entre eux les plus grandes ressemblances. *Il y aurait donc peut-être lieu d'essayer dans le rhinosclérome, surtout à son début, l'introduction au niveau des parties atteintes de la muqueuse, du microbe de l'ozène, dans le but d'opposer le pouvoir raréfiant de celui-ci à l'action hypertrophiante du rhinobacille.*

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DES TOXINES DU CHOLÉRA

PAR LE Dr F. F. WESBROOK,
JOHN LUCAS WALKER STUDENT IN PATHOLOGY, A CAMBRIDGE
(Travail du laboratoire de pathologie de l'Université de Cambridge.)

Nos connaissances sur la chimie pathologique des maladies contagieuses se sont accrues constamment, depuis que Brieger[1] a publié ses recherches sur les ptomaïnes, mais c'est là encore un sujet plus ou moins enveloppé de mystère. Brieger a conclu que c'étaient les toxines spécifiques produites par la multiplication des microbes pathogènes dans les tissus. Par la découverte d'Hankin[2] sur une albumose toxique dans les cultures de charbon; par les nouveaux progrès faits surtout par Brieger et Fraenkel[3], Sidney Martin et autres savants, une nouvelle lumière fut projetée sur la chimie des procès infectieux, et on admit que les principes toxiques appartenaient aux albumines plutôt qu'aux ptomaïnes ou aux substances basiques.

Les corps albumineux, isolés par certains savants, réagissaient les uns comme des albumoses ou des peptones, les autres comme des globulines ou des albumines, et portaient par suite le nom général de toxalbumines. On trouvait ces substances, non seulement dans les produits du métabolisme des microbes cultivés dans les milieux de culture ordinaires ou légèrement modifiés, mais aussi dans les tissus, ainsi que l'ont spécialement montré les recherches de Sidney-Martin[4] sur l'anthrax et la diphtérie.

La conclusion générale de ces observations fut que les

1. BRIEGER, *Berlin. Klin. Woch.*, 1886, p. 284; 1887, p. 314-817, 1888, nº 17 Untersuchungen uber Ptomaines, Berlin, 1885 and 86.

2. HANKIN, On Immunity produced by an Albumose isolated from Anthrax Cultures. (*British Medical Journal*, Oct. 12th, 1889.)

3. BRIEGER UND FRAENKEL, *Berlin. Klin. Woch.*, pp. 241-248, 1890.

4. SIDNEY MARTIN, Preliminary Report on the chemical Products of the life processes of Bacillus Anthracis (19*th Annual Report of the Medical Officer to the Local Government Board*, p. 235, 1889-90), et The Chemical Products of the growth of the Bacillus Anthracis and their physiological Action (*Proceedings of the Royal Society of London, May 22nd*, 1890, et 21*st Annual Report of the Medical Officer to the Local Government Board*, p. 170).

microbes pathogènes produisent leurs lésions spécifiques par le moyen de produits albumineux, formés aux dépens des protéides du corps de l'animal, et que, dans la formation de ces produits, le microbe agit comme une diastase ou sécrète un corps diastasique. Mais tous ceux qui acceptent la notion des toxalbumines s'accordent sur ce point que les produits spécifiques finaux sont des albumines.

Cette conception rencontra de l'opposition, spécialement de la part de Duclaux [1] et de Dzierzgowski et de Rekowski [2].

Le premier critiqua le manque d'une bonne méthode chimique, et exprima ses doutes sur la nature albumineuse de ces corps, qu'il considérait comme distincts et différents des albumines, albumoses, peptones ou globulines, et comme probablement entraînés mécaniquement avec ces substances, pendant le procès de précipitation par l'alcool, le sulfate de magnésium ou les autres précipitants employés. Duclaux cependant n'exprima pas d'opinion sur la nature exacte de ces toxines. Dzierzgowski et de Rekowski arrivèrent aux mêmes conclusions, revinrent à l'idée originelle de la nature alcaloïdique de ces corps, et crurent que ces toxines alcaloïdiques n'étaient pas seulement mêlées mécaniquement avec les précipités protéiques, mais contractaient avec eux une combinaison chimique plus ou moins stable, analogue à celle des alcali-albumines.

De leur côté, Roux et Yersin [3], travaillant sur la diphtérie, isolèrent une substance qu'ils classèrent parmi les diastases.

Ces obscurités n'ont pas été éclaircies par le récent travail sur la diphtérie de Sidney Martin [4], dont nous avons parlé. Il trouva dans les membranes diphtéritiques un corps, analogue à une diastase par sa nature, qui produit les mêmes effets physiologiques que les albumoses, mais possède une plus grande activité. Il pense que « cette diastase, une fois absorbée, digère les protéides des corps en formant des albumoses, et que ce sont

1. Duclaux, *Annales de l'Institut Pasteur*, p. 380, 1890.
2. Dzierzgowski et de Rekowski, Recherches sur la transformation des milieux nutritifs par les bacilles de la diphtérie et sur la composition chimique de ces microbes. (*Archives des Sciences Biologiques à Saint-Pétersbourg*, 1892, t. I, nos 1 et 2; p. 166-197.)
3. Roux et Yersin, *Annales de l'Institut Pasteur*, p. 273-288; 1889, et p. 629-661, 1888.
4. Sidney Martin, *21st Annual Report of the Medical Officer to the Local Government Board*, p. 170.

ces produits de digestion qui amènent la mort, causent la fièvre et la dépression, aussi bien que la paralysie qui est consécutive à la diphtérie ».

Plus récemment Buchner[1] et Uschinsky[2] ont repris à nouveau tout le sujet, et, pour la séparation des substances toxiques, ils ont évité les milieux de culture contenant de l'albumine ou des corps albumineux.

Ils ont trouvé que, dans des solutions d'asparaginate de soude, les germes pathogènes poussent vigoureusement sans perte de virulence, et que les principes toxiques qu'ils fabriquent alors ne donnent plus la réaction des albumoses, et à peine la réaction typique des albumines, de sorte qu'ils les désignent sous le nom vague de diastases et substances albuminoïdes. Il est possible que ces diastases, injectées dans le corps de l'animal, digèrent les protéides des tissus en formant des albumoses à la manière de la diastase diphtéritique, mais dans l'état actuel de nos connaissances, c'est là une simple spéculation ayant besoin de nouvelles recherches pour être confirmée.

En somme il semble que depuis Brieger, les noms donnés par divers savants à ces diverses toxines ont changé suivant le milieu de culture ou la méthode d'extraction. Cela m'a frappé, engagé que j'étais depuis quelques mois dans des recherches sur les albumoses[3] formées par le *Bacillus Anthracis*, et il m'a semblé utile de reviser toute la question. Pour cela, le vibrion du choléra semblait particulièrement favorable. Ses toxines ont été décrites comme des peptones, des globulines, des albumoses et des alcaloïdes: leur nature, d'après mes observations, semblait varier avec la méthode de recherche, et en songeant combien sont incomplètes nos connaissances chimiques sur les substances protéiques et albuminoïdes, on comprend combien il est hasardeux de donner un nom définitif aux toxines. Il semble donc que le meilleur moyen d'arriver à de moins fallacieux résultats est celui qu'a employé le premier Uschinsky[4], et je me con-

1. Buchner, *Münchener Med. Woch.*, 1893. Nov. 24, p. 449 v. 452, and Nov. 25, p. 480-483.

2. Uschinsky, *Centralblatt für Bakteriologie und Parasitenkunde*, Sep. 9th, 1893.

3. Hankin and Wesbrook, Sur les Albumoses et les Toxalbumines sécrétées par le bacille charbonneux. (*Annales de l'Institut Pasteur*, 1892, p. 633-650.)

4. Uschinsky, *Centralblatt für Bakteriologie und Parasitenkunde*, XIV, 10, pages 316-319.

sidère comme heureux d'avoir pu utiliser cette méthode, lorsque ce travail était déjà à peu près terminé.

Dans presque tous les cas on s'est servi du *Vibrio Choleræ Asiaticæ* (Virus Fort : Haffkine), que M. Haffkine a eu la complaisance de me fournir.

La culture du vibrion a été faite dans les milieux suivants :

a) Alcali-albumine (préparée par la méthode de Sidney Martin)[1];

b) Œufs (méthode de Hueppe)[2];

c) Solutions de peptones ;

d) Solution d'asparaginate de sodium (méthode d'Uschinsky)[3].

Dans la plupart des cas, les cultures étaient aérobies; elles ont été anaérobies dans les autres.

On a fait ensuite l'étude chimique des cultures, et on a essayé physiologiquement et comparé les unes aux autres les substances toxiques séparées. On a examiné aussi la relation de ces substances avec la production de l'immunité.

On a étudié de la même façon l'exsudat péritonéal des animaux tués par injection des cultures de vibrions.

On trouvera dans chaque section tous les détails sur l'emploi de chaque méthode.

I

POISONS CHIMIQUES DE LA CULTURE DU VIBRION DANS L'ALCALI-ALBUMINE

Comme on a, jusqu'ici surtout, étudié les toxines des cultures du comma-bacille dans les peptones commerciales ou les milieux peptonisés, il m'a semblé bon d'éviter la présence de toute substance donnant la réaction du biuret, et c'est pour cela que j'ai choisi l'alcali-albumine de Sidney Martin.

1. Sidney Martin : « Preliminary Report on the chemical Products of the life processes of Bacillus Anthracis. » (*19th Annual Report of the Medical Officer to the Local Government Board;* 1889 *and* 1890.)

2. Hueppe : « Sur l'emploi des œufs comme milieu de culture. » (*Centralblatt für Bakteriologie und Parasitenkunde;* Bd. V, 1888, p. 80.)

3. Uschinsky, *Centralblatt für Bakteriologie und Parasitenkunde*, XIV, 10, pages 396-319,

J'ai traité le sérum (de bœuf ou de mouton) centrifugé, par la méthode de Martin, sauf que, au lieu de filtrer après neutralisation, j'ai laissé se déposer au fond du vase l'albumine précipitée et j'ai siphonné le liquide qui la surnageait.

On a rajouté de grandes quantités d'eau distillée, en agitant vigoureusement avec un bâton de verre, et cette opération plusieurs fois répétée a paru préférable à un lavage sur filtre.

Le précipité ainsi lavé a été dissous dans une solution de soude caustique et dilué avec l'eau distillée, de sorte que pour 500 c. c. du sérum originel, on a eu trois litres de solution d'alcali-albumine, contenant 0,1 0/0 d'hydrate de sodium et 0,25 0/0 de chlorure de sodium.

On a filtré à clair le liquide qui a été mis en flacons (500 c. c. dans chacun) et stérilisé à l'autoclave ou par des ébullitions répétées, à des jours successifs, dans un stérilisateur à vapeur.

On a obtenu finalement un liquide clair, légèrement jaunâtre, ne donnant aucune coloration rouge avec le sulfate de cuivre et la potasse caustique, mais qui, lorsqu'on neutralisait sa légère alcalinité, fournissait un coagulum dense et blanc, que faisait disparaître l'addition d'un acide ou d'un alcali dilué. Dans un ou deux cas, on a ajouté des traces de phosphate de sodium.

Les flacons étaient ensuite inoculés avec des vibrions du choléra (virus exalté Haffkine) et placés à l'étuve à 35° où ils restaient trois ou quatre semaines. Au bout de ce temps, on ne voyait plus de comma-bacilles typiques, mais seulement des formes de coccus. La pureté des cultures a toujours été contrôlée par des plaques et des ensemencements nouveaux.

A. *Albumoses dans le liquide de culture.*

Les cultures filtrées au travers de la porcelaine ont fourni un liquide ambré très limpide, légèrement alcalin, et donnant nettement la réaction du biuret.

On l'a soigneusement neutralisé avec HCl étendu et, après l'avoir séparé par filtration du précipité formé, on l'a mis dans un flacon stérile, et évaporé presque à siccité dans le vide à 40°, en ajoutant de temps en temps de l'alcool pour éviter la putréfaction.

La masse visqueuse obtenue a été laissée pendant quelques

jours avec 100 à 200 c. c. d'alcool absolu, et lavée dans de nouvelles quantités du même liquide.

Le résidu lavé a été alors dissous dans quelques centimètres cubes d'eau distillée, et dialysé dans de grandes quantités d'eau distillée fréquemment renouvelée, le tout étant maintenu au froid et dans l'obscurité ; après 36 ou 48 heures, on enlevait le contenu du tube de parchemin, on filtrait et on concentrait à nouveau dans le vide à 40°. La matière avait alors les réactions suivantes :

1° Par saturation avec le sulfate d'ammonium, dense précipité blanc;

2° Par saturation avec le chlorure de sodium, léger précipité blanc; mais quand on filtrait et qu'on rendait le liquide acide par l'acide acétique, nouveau précipité blanc, dense;

3° Chaleur, aucun effet visible ;

4° Réaction nette du biuret.

Ce produit final, après dialyse, semblait donc contenir une petite quantité de proto-albumose, avec une plus grande quantité de deutéro-albumose : c'est ce mélange qu'on a inoculé. Il contenait toujours de l'alcool ou du thymol, ajoutés pour assurer sa conservation, mais il était facile de l'en purifier avant l'injection en le plaçant dans le vide à 40°.

Il a permis non seulement de produire des effets toxiques, mais aussi, à plus faible dose, de produire l'immunité contre des doses mortelles du vibrion de choléra chez les cobayes.

Effets toxiques de l'injection d'albumoses chez les cobayes. — La solution aqueuse d'albumoses fut injectée sous la peau des flancs ou de l'abdomen, à des doses variant de 0,5 à 1,5 c. c. de la solution saturée. Quoique on eut pour objet de produire l'immunité contre une ultérieure injection de vibrions, en donnant ces doses à des séries de quatre animaux, trois périrent après douze, quarante et cinquante heures. Un examen bactériologique et microscopique du sang, de l'exsudat péritonéal, de la rate et du point d'inoculation n'a jamais révélé de développement de microbes.

On dilua alors la solution à la moitié de sa force originelle et on donna les mêmes doses de dilution à six animaux, sur lesquels deux succombèrent. Les quatre autres, et le survivant de la première expérience, furent étudiés pour leur immunité contre des cultures vivantes.

Effets immunisants des injections sous-cutanées d'albumoses. — Une semaine après l'inoculation, les quatre survivants furent

soumis à l'action de doses mortelles de bacilles du choléra très virulents, provenant d'une culture de douze heures, en tube incliné, sur sérum coagulé. La culture raclée avait été mise en suspension dans du bouillon, dans un vase stérile, et bien agitée, de sorte que chaque animal recevait la même quantité de la même matière. Les injections furent faites dans le péritoine. Trois des quatre animaux montrèrent un haut degré d'immunité et survécurent, pendant que les animaux de contrôle mouraient en trois heures et demie, sept heures et neuf heures. Le quatrième animal vacciné mourut pendant la nuit, quelques heures après les témoins, et, à l'autopsie, son liquide péritonéal fut trouvé plein de cellules avec peu de bacilles, tandis que dans les témoins, il y avait des masses de bacilles et très peu de cellules. Le seul survivant de la première expérience avec la toxine concentrée fut aussi trouvé doué de l'immunité, au bout d'une semaine, à une dose qui fut fatale au témoin et le tua avec les symptômes et les désordres ordinaires.

Ces expériences montrent clairement à la fois le pouvoir toxique et immunisant des albumoses.

Il est inutile de donner des détails sur d'autres séries d'expériences du même ordre. Elles ont prouvé que des injections sous-cutanées d'albumoses, préparées comme ci-dessus, peuvent donner l'immunité contre des injections intra-péritonéales du bacille-virgule vivant.

Albumoses préparées par précipitation avec le sulfate d'ammonium. — On a obtenu les mêmes résultats avec des albumoses préparées par saturation avec le sulfate d'ammonium.

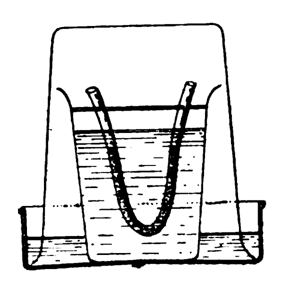
La méthode de préparation était celle d'Hankin, sauf que, après filtration sur la porcelaine, l'alcali-albumine non encore digérée était précipitée par neutralisation, et séparée par le filtre : sans cela elle se fût précipitée au moment de la saturation par le sel.

B. *Le liquide de dialyse des albumoses.*

Dans deux séries d'expériences, la dialyse a été prolongée dans la même eau distillée; une fois pendant soixante-douze heures, l'autre fois pendant une semaine.

Il a fallu pour cela éviter la putréfaction, en mettant le vase

au froid et en ajoutant de temps en temps l'alcool au liquide, à l'intérieur et à l'extérieur de la membrane dialysante [1].



Le liquide de dialyse a été concentré dans le vide à 40°. Il donnait les réactions suivantes :

1° Réaction distincte du biuret;

2° Léger précipité par saturation avec le sulfate d'ammonium ou le chlorure de sodium.

Il semblait donc formé de peptone, avec une trace d'albumose, qui se dialyse moins faiblement que la peptone.

Action sur les cobayes. — Il a été impossible d'obtenir cette substance en quantité suffisante pour lui faire produire des effets toxiques, mais en inoculant comme à l'ordinaire par voie sous-cutanée, on a vu qu'elle avait un pouvoir immunisant. Dans presque tous les cas, les animaux inoculés ont supporté des injections intra-péritonéales du microbe vivant, qui tuaient les cobayes de contrôle avec les symptômes ordinaires, dans des temps variant de huit à vingt-quatre heures. Là où l'immunité n'était pas complète, les animaux traités manifestaient un degré de résistance marqué par le délai de leur mort et la présence d'un plus grand nombre de cellules dans le liquide péritonéal, à l'autopsie. Les témoins mouraient toujours avant l'animal traité et ne montraient pas les mêmes preuves de résistance cellulaire dans l'exsudat péritonéal.

1. L'appareil ci-dessus rend facile une dialyse prolongée dans des conditions aseptiques. Un tube de verre, attaché si c'est nécessaire, soutient un tube de parchemin rempli de la solution d'albumoses et plongeant dans de l'eau distillée stérilisée. Sur ce premier vase en est renversé un second, dont les bords plongent dans une solution de sublimé. L'appareil qui ressemble à une grande boîte de Pétri est stérilisé à l'autoclave, avec le milieu de dialyse.

On enlève le couvercle pour introduire dans le tube de parchemin, avec une pipette stérilisée, le liquide à dialyser.

C. *Précipite par neutralisation.*

Il restait maintenant à étudier le précipité obtenu en neutralisant les cultures filtrées de l'origine. La quantité en variait suivant l'âge de la culture, diminuant constamment, mais n'étant jamais nulle; l'expérience a été faite trois fois par les mêmes méthodes et avec les mêmes résultats. Il suffira d'en décrire une.

Une culture de treize jours sur alcali-albumine a été filtrée sur porcelaine et ne donnait plus ensuite, par neutralisation, qu'un faible précipité. Le filtre a été ensuite lavé avec une solution à 5 0/0 d'hydrate de sodium, et le liquide de filtration limpide, presque incolore, donna par neutralisation soigneuse avec HCl dilué, un abondant précipité blanc.

Ce précipité fut réuni sur un filtre et abondamment lavé, pendant deux heures, avec de l'eau distillée, jusqu'à ce que la filtration fut incolore et ne donna plus la réaction du biuret. Il fut ensuite dissous dans une petite quantité d'eau distillée, légèrement alcalinisée par de la soude caustique, et filtré à nouveau, de façon à fournir un liquide qui ne donnait pas la réaction du biuret, mais qui fournissait par précipitation un copieux précipité floconneux blanc. Ce précipité semblait ne pas contenir de peptones ou d'albumoses, mais était probablement de l'alcali-albumine non digérée pendant la culture. Il peut y avoir eu de l'anti-albumose, mais ses réactions sont celles de l'alcali-albumine, et il n'y a moyen de l'en distinguer que par la digestion.

Ce précipité purifié, en solution claire et faiblement alcaline, a servi pour des injections sous-cutanées au cobaye.

Je n'ai pas eu assez de matière pour amener la mort, mais les doses inoculées ont donné un degré marqué d'immunité contre une inoculation intra-péritonéale ultérieure, faite avec des cultures vivantes et virulentes qui, aux mêmes doses, tuaient sûrement en quelques heures les animaux de contrôle.

Il y avait donc là une substance qui, sans donner les réactions des peptones ni des albumoses (si nous en exceptons les anti-albumoses), était pourtant capable de donner, autant que les albumoses, une immunité contre le virus vivant.

II

POISONS CHIMIQUES DU VIBRION DU CHOLÉRA CULTIVÉ DANS LES ŒUFS

Les recherches de Scholl [1] sur les toxines produites par les bacilles du choléra cultivés dans les œufs, présentaient comme possible la préparation d'une toxine assez puissante et assez abondante pour se prêter à une purification complète.

Ce savant dit avoir obtenu une substance contenant des peptones, et qui, inoculée dans le péritoine de cobayes à la dose de 5 c. c., les tuait en quelques minutes. Il a aussi isolé une globuline presque aussi puissante. Il a vu enfin que 4 c. c. de la culture dans l'œuf, âgée de trois semaines, pouvaient amener la mort de l'animal en quinze minutes.

Pour obtenir des toxines semblables, on a inoculé des œufs frais comme le faisait Hueppe, et, après les avoir couverts d'une couche de collodion, on les a mis à l'étuve à 35° pendant trois semaines, après quoi on a éprouvé la pureté et la virulence de la culture. Sauf un petit nombre de coagulums noirs, le contenu des œufs était devenu liquide et ils répandaient l'odeur typique des cultures de choléra.

L'inoculation intra-péritonéale de doses de 1 à 7 c. c., a donné les symptômes suivants chez des cobayes :

1° Collapsus immédiat et chute de la température au-dessous de 35° dans l'intervalle de treize minutes à deux heures : cette basse température persiste et se prononce de plus en plus jusqu'à la mort;
2° Tremblement dans les membres et crampes abdominales ressemblant à des tentatives de vomissement ;
3° Salivation dans quelques cas;
4° Mort après un intervalle variant de sept à vingt-huit heures, mais jamais après quinze minutes, car même des doses de 6 à 7 c. c. n'ont jamais amené la mort en moins de sept à dix heures.

C'est peut-être à cause de différences dans les cultures que mes produits étaient moins virulents que ceux de Scholl. Je me suis toujours servi du *virus exalté* de Haffkine.

Des inoculations sous-cutanées de 0,5 à 1 c. c. ne tuaient pas d'une façon sûre; mais, quand l'animal mourait, il y avait une élévation temporaire de la température, suivie en quelques

1. Scholl, Untersuchungen über giftige Eiweisskorper bei Cholera asiatica und einigen Faulniss-processen. (*Archiv. für Hygiene*; XV, 1892 ; p. 172-215.)

heures d'une dépression graduelle jusqu'à la mort. Dans tous les cas mortels, l'autopsie révéla des masses de vibrions qui avaient pénétré dans le péritoine, la mort étant la conséquence de cette infection.

Les toxines ont été extraites à la façon ordinaire, en mettant les œufs dans l'alcool absolu où on les laissait quelque temps[1]; on réunissait alors le précipité et on le lavait sur un filtre jusqu'à ce que le liquide passé n'eût plus aucune couleur jaune.

En faisant l'extraction par l'eau distillée et en agitant quelques heures, ce précipité donnait une solution blanche que des filtrations répétées ne rendaient pas limpide. Cette solution alcaline donnait les réactions suivantes :

1° Très légère réaction du biuret ;

2° Fort précipité blanc par la chaleur, dû probablement à la globuline que l'alcool n'avait pas coagulée ;

3° Fort précipité blanc par saturation avec le sulfate d'ammonium ou le chlorure de sodium.

Ce mélange impur produisit des symptômes toxiques prononcés par injection à dose suffisante dans le péritoine de cobayes : collapsus immédiat, chute de la température, crampes, parfois salivation. La mort survint au bout de quatre à dix heures. A plus faible dose, l'inoculation amena une immunité marquée contre une inoculation ultérieure.

L'impossibilité d'obtenir des solutions claires et la nécessité d'employer de fortes doses rendaient si incertaine la tâche de séparer la toxine qu'on y a renoncé.

III

CULTURES ANAÉROBIES

Pour obtenir des toxines plus puissantes que les précédentes, on a essayé des cultures anaérobies, suivant la méthode de Hueppe et Scholl; on a opéré de la façon suivante :

1° On a étiré le col d'un flacon rempli d'un milieu de

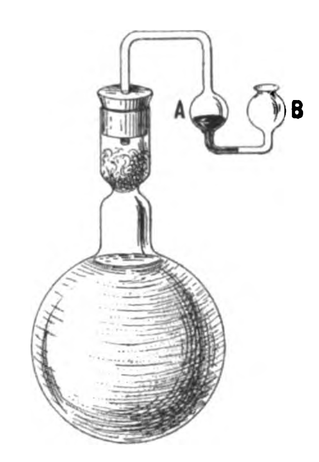
1. Les œufs qui ont été laissés six semaines au contact de l'alcool sont devenus si insolubles qu'il ne s'en dissolvait plus que très peu dans l'eau distillée, et cet extrait aqueux ne donnait les réactions ni des peptones ni des globulines, mais seulement une faible réaction xanthoprotéique. Il était sans action, quand on l'injectait aux cobayes.

culture stérilisé et ensemencé avec le bacille du choléra. On a ensuite fait le vide par le moyen d'une pompe de Sprengel, l'ébullition se produisant à 37°. On a alors fermé à la lampe;

2° Dans d'autres cas on a remplacé l'air des flacons par de l'hydrogène et on a fermé le vase comme ci-dessus;

3° On a aussi scellé les tubes et flacons sans en extraire l'air, qui perdait peu à peu son oxygène, les microbes s'habituant ainsi peu à peu à la vie anaérobie[1].

Au bout d'un à trois jours, il y avait à la surface du liquide une légère couche qui restait bientôt stationnaire. On a démontré



comme il suit que cet arrêt de croissance était dû à l'absence d'oxygène.

Le col d'un flacon contenant du bouillon, de la peptone, de l'alcali-albumine ou tout autre liquide nutritif a été étiré, fermé par un tampon de coton et stérilisé à l'autoclave; après l'avoir ensemencé avec le bacille virgule, on a poussé le tampon contre l'étranglement et on a adapté un bouchon de caoutchouc muni d'un tube à boules A[2], contenant un peu de mercure.

En plaçant le tout à l'étuve, il y a eu d'abord une augmentation de pression due à la chaleur; mais, après vingt-quatre à quarante-huit heures, le mercure témoignait d'une forte pres-

1. J'ai vu dans un cas de culture dans la peptone commerciale, où le tampon avait été couvert d'une couche de paraffine, ce tampon être aspiré le long du col et arriver en cinq jours dans le liquide de culture, qu'il contamina.

2. Ce manomètre a été employé par Hankin, dans toutes les cultures anaérobies, comme soupape d'échappement pour les gaz.

sion négative. Il y avait un peu de trouble et une culture superficielle qui n'avait pas augmenté après six semaines d'étuve ; à ce moment, on a ouvert pour étudier la pureté et la virulence de la culture. On replaça alors le tampon de coton, mais non la soupape, et on observa de suite une multiplication rapide dans ce flacon où l'air avait de nouveau accès. Il en a toujours été de même : pas de culture appréciable quand on empêchait l'accès de l'air, culture vigoureuse quand on le rendait.

Effets toxiques des cultures anaérobies. — Scholl [1] dit avoir tiré des cultures anaérobies dans les peptones commerciales, deux peptones, dont l'une tuait en sept minutes les cobayes et autres rongeurs.

J'ai fait plusieurs fois la même expérience, par les moyens variés décrits plus haut, et dans divers milieux de culture : alcali-albumine, asparaginate de sodium, deux variétés de peptones commerciales, et toujours sans succès.

Après une incubation de vingt et un à quarante jours, ces cultures étaient incapables de produire la mort ; alors même qu'on les injectait à des doses de 7 à 12 c. c., elles semblaient tout à fait inoffensives.

Il a toujours été impossible non seulement d'obtenir des cultures virulentes, mais même des cultures vigoureuses, en l'absence complète de l'oxygène, ou même lorsqu'on laissait celui qui restait dans les liquides du flacon au moment du scellement ou de la fermeture.

Peut-être cet insuccès tient-il, comme nous l'avons dit plus haut, à ce que les vibrions de Scholl étaient plus vigoureux que les miens.

Pensant que peut-être la longue culture sur gélose du deuxième vaccin de Haffkine, avec passage intermittent chez les animaux, le rendait incapable de supporter la vie anaérobie, je me suis procuré, grâce à l'obligeance de M. le D[r] Klein, deux cultures provenant des cas de choléra de Grimsby et de Yarmouth. Bien qu'elles fussent de date toute récente, je n'ai pas mieux réussi avec elles.

1 SCHOLL, *Archiv. für Hygiene:* XV, 1892, p. 172-215.

IV

TOXINES DE L'EXSUDAT PÉRITONÉAL DU COBAYE

A l'autopsie de chaque cobaye de contrôle, on a aspiré, au moyen d'une pipette stérile, le liquide péritonéal, et on l'introduisit de suite dans l'alcool absolu, où on l'a laissé séjourner, en agitant fréquemment pour assurer la précipitation complète.

Cinq semaines après la collecte du dernier liquide, on a filtré l'alcool et recueilli le précipité sur un disque filtrant, où on l'a lavé soigneusement avec de l'alcool de même force.

Ce précipité a été épuisé ensuite par l'eau distillée, après une agitation de quelques heures à la machine, et une nuit de repos dans un endroit frais : il restait assez d'alcool pour prévenir l'intervention des microbes. Finalement on a filtré et recueilli un liquide ambré.

L'extrait alcoolique a été évaporé à sec à 40° dans le vide et extrait de nouveau par l'alcool absolu. Un peu de matière a refusé de se dissoudre dans l'alcool et a été redissoute dans l'eau, puis ajoutée à l'extrait aqueux.

L'extrait alcoolique et l'extrait aqueux du précipité par l'alcool ont été concentrés dans le vide à 40° et étudiés.

a) *Extrait aqueux.* — Liquide jaunâtre, opalescent, pâle, ayant une faible réaction alcaline, bien qu'on ait ajouté quatre gouttes d'HCl à l'alcool employé pour l'extraction.

1° Il ne donnait pas de réaction du biuret;
2° Il devenait un peu plus limpide à l'ébullition ;
3° Bouilli avec l'acide nitrique et additionné ensuite d'ammoniaque, couleur jaunâtre non orange (réaction xanthoprotéique);
4° Faible précipité rouge avec la liqueur de Millon.

b) *Extrait alcoolique.* — Solution alcoolique brune et limpide dont voici les réactions :

1° Insoluble dans l'eau froide et donnant un liquide trouble ;
2° Clarification par la chaleur ;
3° Odeur vive et piquante, s'attachant aux mains et aux liquides avec lesquels le liquide entrait en contact ;
4° Pas de réaction xanthoprotéique.

J'avais peu de ces extraits, et la source n'en était pas abondante : je n'ai pu faire qu'un petit nombre d'expériences, mais

qui m'ont fourni des résultats curieux non seulement quant à la toxicité, mais encore quant au pouvoir immunisant du liquide.

Extrait aqueux. — On en a injecté 4 c. c. (2 c. c. dans chaque flanc) à un cobaye brun, et 1 c. c. dans le flanc droit d'un cobaye pie. L'injection a eu lieu à 3 heures 25. Voici les relevés de température avant et après l'injection :

Heures.	Cobaye brun.	Cobaye pie.
2,40	39,0	38,9
3,15	38,8	38,3
3,25	Inoc.	Inoc.
3,40	38,4	38,5
4,00	37,9	38,4
4,40	36,3	39,4
5,15	35,0	39,6
5,55	»	39,8
6,15	»	39,8
6,45	»	40,0
7,30	»	40,7
9,00	»	40,3

Pour le cobaye brun, on n'a pas suivi la marche de la température au-dessous de 35°, la graduation du thermomètre ne l'ayant pas permis. A 9 heures du soir. ce cobaye était mourant, on l'a trouvé mort le lendemain.

Le cobaye pie était au contraire vivant et bien portant le lendemain, et éprouvé six jours après; il a supporté sans trouble apparent une dose de vibrions vivants qui a tué en dix heures, avec les symptômes habituels, un animal deux fois plus gros que lui.

Extrait alcoolique, évaporé à siccité, et mis en suspension dans l'eau. Injection sous-cutanée, à 5 heures 35, à deux cobayes : l'un A en a reçu 3 c. c.; l'autre B, plus gros, 1 c. c. Voici le relevé des températures :

Heures.	Cobaye A.	Cobaye B.
2,40	39,2	38,7
3,15	39,1	38,9
5,15	39,2	39,1
5,35	Inoc.	Inoc.
5,55	38,1	38,3
6,15	37,8	38,2
6,45	36,8	38,3
7,30	35,4	39,2
9,00	36,0	40,8
9,45	36,8	»

Le cobaye A, éprouvé six jours après pour son immunité, a succombé trois heures et demie après le témoin qui était deux

fois plus gros. Beaucoup de fluide péritonéal rempli de cellules, peu de bacilles. Le cobaye témoin avait des masses de bacilles et peu de cellules.

Le cobaye B a survécu à l'inoculation d'épreuve, faite six jours après ; mais il était deux fois plus gros que les autres animaux. Il était pourtant de même taille que le témoin qui a succombé.

Il est impossible de tirer des conclusions précises de ce petit nombre d'expériences.

L'extrait alcoolique ne semble pas aussi toxique que l'extrait aqueux, et son inoculation n'a pas donné un haut degré d'immunité. L'extrait aqueux était à la fois toxique et immunisant. Dans une autre expérience avec un extrait aqueux retiré aussi d'une exsudation péritonéale d'animaux témoins, le pouvoir immunisant a été aussi clairement établi.

On n'a pu obtenir des quantités suffisantes de cet exsudat, les seuls animaux qui le fournissaient étant des animaux de contrôle.

V

POISONS CHIMIQUES DE LA CULTURE DANS UN MILIEU NON ALBUMINOÏDE

Les résultats de Buchner et Uschinsky (*l. c.*) sur la culture dans un milieu non albuminoïde, m'ont suggéré un moyen de jeter une lumière nouvelle sur la nature de la toxine ou des toxines du comma bacille : ce milieu a été préparé avec les quelques modifications mentionnées :

Chlorure de sodium	5 à 7
Chlorure de calcium	0,1
Sulfate de magnésium	0,2
Phosphate de sodium [1]	2,5
Lactate d'ammonium	6 à 7
Asparaginate de sodium	3,4
Eau [2]	1000,0

1. Substitué au phosphate de potassium, à cause de l'action dépressive et toxique des sels de potasse sur les rongeurs.

2. On n'a pas mis de glycérine, parce que la culture était aussi abondante en son absence, et parce qu'elle rendait difficile l'évaporation à siccité.

Le liquide obtenu était limpide, incolore, et neutre au tournesol. Après stérilisation à l'autoclave, il a été ensemencé avec du bacille du choléra. Après quatre jours, comme il n'y avait pas de culture visible, on a ajouté une petite quantité de solution stérilisée d'hydrate de sodium, de sorte que le liquide en contenait 0,5 0/0.

Cette addition a toutefois précipité des flocons amorphes et de fines aiguilles formées de phosphate de chaux et de phosphate ammoniaco-magnésien, qui sont tombés au fond du vase.

Après réensemencement, on a eu une culture vigoureuse, typique, donnant un trouble général avec de l'écume à la surface.

On a laissé à l'étuve trois au quatre semaines, au bout desquelles le liquide était presque partout devenu légèrement jaunâtre et opaque. La plus grande partie de l'écume et des précipités, dus à la multiplication des bacilles, formaient, avec les phosphates gélatineux, une masse visqueuse au fond des flacons, surtout de ceux qui avaient été agités par intervalles. Il n'y a pas eu d'indol formé, ni d'odeur apparente pendant la culture.

Après vingt à trente jours, on a filtré sur la porcelaine stérilisée, et obtenu un liquide limpide, légèrement jaunâtre ou ambré. La filtration a été beaucoup plus difficile qu'avec les milieux albuminoïdes.

Le liquide filtré de 250 c. c. de culture a été évaporé à siccité dans le vide à 40°, et agité pendant trois heures, dans une machine, avec 250 c. c. d'alcool absolu, puis abandonné pendant quarante-huit heures, en l'agitant violemment de temps en temps. Le précipité a été réuni sur un filtre, et soigneusement lavé à l'alcool, puis dissous dans 50 c. c. d'eau distillée, dialysé soixante-douze heures à la façon ordinaire, en présence de 1,250 c. c. d'eau distillée qu'on a changée deux fois. Finalement on a évaporé à sec à 40°, et dissous dans 10 c. c. d'eau distillée. Le produit final était une substance transparente, brune, non cristalline, soluble dans l'eau, et fournissant les réactions suivantes :

1° Légèrement alcaline au tournesol;
2° Pas de précipité à la neutralisation ;
3° Pas de réaction du biuret;
4° Légère réaction xanthoprotéique.

Action sur les cobayes. — Sur trois cobayes qui en ont reçu chacun 1 c. c. sous la peau, deux sont morts en neuf et onze heures : le troisième s'est rétabli.

Chez ce dernier, la température a baissé graduellement pendant cinq heures jusqu'au-dessous de 35°, et est redevenue ensuite normale; chez les autres, elle a baissé jusqu'à la mort.

Cette toxine, à faible dose, a produit l'immunité contre des doses mortelles de cultures vivantes.

La viscosité extrême du précipité dans les cultures avec asparagine, et la difficulté de filtration font croire qu'une grande partie de la toxine n'a pas du tout traversé le filtre. Pour éviter cette difficulté, on a commencé par laver le précipité avec une solution de soude caustique à 5 0/0 qui dissolvait une proportion notable des corps des microbes.

Une solution étendue (3 0/0) d'acide chlorhydrique, poussée alors à travers le filtre, a dissous les phosphates, et aussi, comme on l'a vu plus tard, un peu de la matière du filtre.

Le mélange des deux liquides très limpides a donné un fort précipité gélatineux qu'on a laissé déposer et lavé sur filtre pendant trente-six heures, jusqu'à disparition de toute réaction xanthoprotéique dans le liquide et dans le précipité, qui était une masse gélatineuse consistant en phosphates insolubles et sels d'alumine du filtre. Des doses de 5 c. c. d'une émulsion de ce précipité gélatineux ont tué un cobaye, en douze et vingt-quatre heures, Les mêmes doses, chauffées à 120° à l'autoclave, n'étaient plus mortelles, tout en donnant un collapsus dont l'animal se rétablissait en peu d'heures.

Les deux lots d'animaux inoculés ont présenté les mêmes symptômes de collapsus rapide : dyspnée, crampes et chute immédiate de température. Chez ceux qui ont reçu le virus chauffé, la température a regagné ou dépassé la normale après quelques heures, pendant qu'elle restait au-dessous de la normale chez les autres, avec chute graduelle jusqu'à la mort.

Il y avait donc là un précipité de substances chimiques ayant entraîné un ou plusieurs corps inconnus capables d'amener la mort. Bien que le précipité eût été lavé jusqu'à disparition de toute trace de matière albuminoïde, décelable par la réaction xanthoprotéique ou d'autres réactions, en brûlant la matière

elle se charbonnait et montrait contenir de la matière organique[1].

CONCLUSIONS

Les recherches qui précèdent montrent que les substances, retirées de cultures du vibrion cholérique dans divers milieux, n'ont pas la même constitution chimique, autant que nous pouvons en juger par les méthodes usuelles, et qu'il y a pourtant une certaine uniformité dans leurs effets physiologiques. Ainsi :

1° De cultures sur l'alcali-albumine, on retire :

a) Une deutéro-albumose;
b) Des traces de proto-albumose;
c) Des quantités variables d'une matière protéique (probablement de l'alcali-albumine).

2° De cultures sur l'œuf :

a) Un mélange de matières protéiques impossibles à séparer.

3° De l'exsudat péritonéal :

a) Une substance qui, tout en donnant une légère réaction xanthoprotéique, ne contenait en apparence ni deutéro-albumose ni proto-albumose.

4° Des cultures sur l'asparaginate de sodium :

a) Une substance qui donnait une faible réaction xanthoprotéique, mais pas celle du biuret.

Ces substances semblent différentes dans leur nature chimique et se ressemblent dans leur action physiologique.

Elles produisent toutes des effets mortels, ou, à petites doses, elles donnent une immunité marquée vis-à-vis des cultures vivantes.

1. J'ai purifié de la peptone de Grubler, par saturation avec le sulfate d'ammoniaque, que j'ai éliminé ensuite avec l'hydrate et le carbonate de baryte, par la méthode de Kühne et Chittenden. Je m'en suis servi comme milieu de culture en solution faiblement alcaline, et après addition d'un peu de sel marin. En filtrant et évaporant, on obtient un liquide brun limpide, qui, saturé par le sulfate d'ammoniaque, a donné à nouveau un précipité qu'il ne donnait pas avant culture. Ce précipité purifié produisait des effets toxiques sur les cobayes, auxquels on l'inoculait en solution faiblement alcaline.

Il est très difficile d'obtenir en grande quantité cette peptone purifiée; c'est pour cela qu'on en a abandonné l'usage pour employer la solution d'asparagine.

J'ai vu aussi qu'on avait de bons développements avec de vieux bouillons de culture inoculés plus de onze mois auparavant. Ces cultures, fermées au coton, étaient restées à la température ordinaire.

Ainsi nous avons trouvé des matières qui, autant que nous pouvons l'affirmer avec nos méthodes imparfaites, appartiennent aux peptones sans albumoses, et donnent les mêmes effets physiologiques que les toxines isolées de l'exsudat péritonéal des cobayes morts après inoculation du choléra, toxines qui pourtant ne contiennent aucune quantité appréciable de peptone ou d'albumose.

Dans le cas des cultures sur alcali-albumine, l'immunité obtenue par le précipité produit par la neutralisation (quoique privé de peptone et d'albumine), était aussi marquée que celle que donnaient les proto et deutéro-albumoses (privées d'alcali-albumine).

Les seules conclusions sont donc que : ou bien le vibrion du choléra donne différents produits chimiques quand on le cultive dans différents milieux, ce qui, *a priori*, est extrêmement improbable; ou bien sa toxine est une substance constante et uniforme associée avec les matériaux protéiques contenus dans le milieu de culture, ou formés pendant la culture. Il semble probable que, dans un milieu de culture privé de substances protéiques, la toxine est plus pure. Au moins, est-il très remarquable que dans ce milieu la toxine est presque débarrassée de toute substance protéique appréciable, et ne donne aucune des réactions qui permettraient de la classer dans les albumoses, peptones, globulines ou alcaloïdes.

Ces recherches tendent donc à confirmer l'opinion de Duclaux [1], à laquelle nous avons fait allusion plus haut, et suivant laquelle les substances, si souvent décrites comme toxalbumines, sont des mélanges d'albumines et de toxines, plutôt que de vrais composés chimiques.

1. Duclaux, *Annales de l'Institut Pasteur*, p. 380, 1890.

LA RAGE EXPÉRIMENTALE CHEZ LE CHAT

PAR MM. LES DOCTEURS

L. DE BLASI ET G. RUSSO TRAVALI

(Institut antirabique municipal de Palerme.)

On sait tout ce que les expériences modernes ont ajouté aux notions cliniques et pathologiques que nous avions sur la rage, et c'est à elles qu'il faut s'adresser pour éclaircir ce qui reste de points obscurs. Divers observateurs, parmi lesquels Magendie, Bader, Cappello, Rossi, Breschet, ont émis l'opinion, basée sur des observations cliniques, que le virus rabique, dans ses passages successifs par morsure de chien à chien, modifie sa virulence de façon à ne pouvoir plus être transmis à l'homme par morsure, après deux ou trois passages sur le chien.

L'inoculation endocranienne, par la sûreté qu'elle donne à la transmission de la rage, a permis de transporter la question du domaine de la clinique dans celui de l'expérimentation, et Celli et Marino-Zuco ont tiré de leurs recherches la conclusion que « dans ces passages successifs de chien à chien, le virus rabique, soit des rues, soit de l'homme, se modifie en ce sens qu'après six à dix passages au maximum, la forme furieuse se perd, et on n'observe d'ordinaire que la forme paralytique ou consomptive... Si pourtant on tient compte de la durée de la période d'incubation, on pourrait dire qu'en définitive et en général, après un certain nombre de passages et aussi de variations d'intensité, ce virus va en s'atténuant, si bien qu'alors il est rarement transmissible au lapin [1]. »

Que le virus des rues n'ait pas toujours la même intensité, c'est ce que démontre la durée variable d'incubation de la rage qu'on observe souvent chez le lapin qu'il a servi à inoculer. Cette durée est d'ordinaire de 15 à 20 jours, mais il n'est pas rare qu'elle soit plus longue ou plus courte. Sur 374 inoculations

1. *Annali dell'Istituto d'Igiene sper. di Roma*, t. II, p. 63, 1892.

d'épreuve, faites depuis les sept ans de fonctionnement de l'Institut de Palerme, nous avons vu un cas où les premiers symptômes de paralysie ont éclaté au bout de 3 jours chez le lapin inoculé, qui est mort le 7e jour, et un passage nouveau sur un second lapin, qui fut pris de la rage le 14e jour, montra que la diagnose du premier cas avait été exacte [1].

Dans 3 cas, la paralysie survint le 7e jour; dans 3 autres en 9; dans 2 après 10, et dans 5 après 11 jours. Nombreux sont les cas où l'échéance a été de 12 à 13 jours. Mais nous en avons un où elle a été de 28 jours, un autre de 39, un autre de 46 et un dernier de 47 jours.

Sur 18 inoculations faites avec la substance nerveuse de chats, la période d'incubation s'est maintenue ce qu'elle était avec le chien; une seule fois on a eu la rage après 11 jours.

Sachant donc que le virus rabique n'a pas toujours chez le chien la même intensité, et qu'il s'atténue dans les passages successifs de chien à chien, il faut admettre qu'il existe dans la nature des conditions qui le renforcent quand il est atténué, de façon à permettre la perpétuité de cette maladie très ancienne.

Ces conditions peuvent exister soit en dehors de l'organisme animal, soit dans cet organisme lui-même.

On sait que le virus rabique résiste peu aux agents physiques, et nous avons montré [2] qu'il se laisse facilement affaiblir et détruire. On peut donc concevoir l'existence, en dehors de l'organisme, de ces conditions qui affaiblissent, maintiennent ou renforcent la virulence. Nous avons aussi voulu voir si un affaiblissement de l'organisme animal ne contribuerait pas à augmenter la virulence du virus rabique, comme il le fait pour presque toutes les maladies infectieuses. Cet affaiblissement, nous avons cherché à l'obtenir par un jeûne complet; mais nous avons vu quatre vigoureux lapins mourir ainsi en 4 ou 5 jours, avant l'apparition de tout symptôme de rage. Nous avons dû nous contenter de soumettre l'animal à une alimentation insuffisante.

1. Rappelons que nos lapins pèsent en moyenne de 1,000 à 1,200 grammes et que notre longue pratique des inoculations nous permet d'affirmer que la concentration et la quantité de liquide inoculé sont presque toujours les mêmes. On sait, en effet, que la période d'incubation de la maladie peut varier suivant le poids de l'animal et la quantité de virus inoculé.

2. *Riforma medica*, 1889, p. 602.

Huit lapins de 1,200 à 1,300 gr. ont été soumis pendant cinq jours à la ration journalière de 80 grammes de verdure, et le 4e jour, au moment où ils avaient perdu 100 à 150 grammes de leur poids, ils ont reçu par trépanation du virus de passage. Puis on a continué la diète. La paralysie est survenue chez tous le 6e jour et la mort le 7e jour, au moment où ils avaient perdu environ 300 grammes de leur poids.

Comme on voit, l'effet de la diète a été nul sur la période d'incubation du virus fixe. Il était intéressant de savoir s'il en était de même pour la rage des rues. Comme la ration précédente ne laisse pas vivre le lapin plus de 10 à 11 jours, il a fallu l'augmenter un peu pour ces nouvelles expériences. Quatre lapins, qui recevaient par jour 40 grammes de son et 60 grammes de verdure, ont reçu par trépanation, après quatre jours de ce régime, du virus des rues, et deux autres, inoculés comme animaux de contrôle, ont continué à recevoir en moyenne 75 grammes de son et 180 grammes de verdure. Un des quatre premiers lapins est mort par accident; chez les trois autres, la paralysie est survenue en 16 à 18 jours, comme chez les lapins de contrôle.

L'affaiblissement de l'organisme par alimentation insuffisante semble donc incapable de renforcer le virus fixe ou le virus des rues[1].

Nous avons cherché dans une autre direction. On sait, par les expériences de M. Pasteur, que le virus rabique s'atténue par passage au travers du singe, et se renforce au travers des cobayes et des lapins. Ces deux dernières espèces ne jouant

1. Nous avons voulu répéter ces expériences sur des pigeons. On sait que ces animaux sont peu aptes à prendre la rage (*Gibier*, C. R. Acad. de sc., 1884) et guérissent spontanément après avoir présenté des symptômes différents de ceux des autres animaux. Il était donc utile de rechercher si l'affaiblissement organique préparait chez eux un terrain plus propre au développement du virus, et avait une influence sur la marche de la rage.

Quatre pigeons (300, 380, 435 et 500 grammes) furent soumis pendant huit jours à une alimentation réduite de 20 grammes de froment pour chacun par jour. Ils avaient alors perdu environ 100 grammes de leur poids, et ils furent alors inoculés avec de la substance cérébrale; les deux premiers avec du virus fixe, les deux autres avec du virus des rues provenant de la moelle d'un chien mort de rage furieuse et ayant subi un premier passage par le lapin. Après deux mois de la même alimentation, les pigeons pesaient 196, 250, 290 et 330 grammes. Ils n'avaient présenté aucun symptôme de rage.

Une autre expérience fut faite de même sur quatre autres pigeons, sans qu'on ait rien vu qui pût faire soupçonner une maladie rabique. De ces pigeons un est mort un mois, l'autre 36 jours après l'inoculation. Les deux autres furent tués après deux mois; les quatre cerveaux mis en émulsion et inoculés à des cobayes n'ont produit aucun effet.

d'ordinaire aucun rôle dans la transmission de la rage à l'homme ou au chien, on ne peut pas les faire intervenir dans l'explication du renforcement naturel du virus rabique. Mais il restait à voir si le même renforcement ne s'observerait pas aussi chez un animal domestique capable de transmettre la rage à l'homme et au chien. Nous avons pensé au chat. La statistique déjà assez ancienne de l'Institut Pasteur montre que sur 11,729 animaux mordeurs, le chat figure 736 fois et le chien 10,922 fois. C'est une proportion de 1 à 15. Le chat est donc un agent assez fréquent de transmission.

Nous nous sommes posé à ce sujet diverses questions.

I

QUELLE EST LA DURÉE D'INCUBATION CHEZ LE CHAT ET CHEZ LE CHIEN INOCULÉS AVEC LE VIRUS DE LA RAGE DES RUES ?

Le 5/3/93 : inoculation intracranienne d'un chat et d'un lapin avec la moelle d'un chien suspect de rage. — 16/3 : le chat est très agité, miaule continuellement d'une voix rauque, et tente de se jeter sur qui l'approche. On fait l'examen des urines qui sont rares; pas d'albumine ni de sucre. La même recherche, plusieurs fois répétée dans d'autres expériences, soit avec le virus fixe, soit avec le virus des rues, a toujours été négative. — 19/3 : commencement de paralysie chez le chat. — 22/3: symptômes de paralysie chez le lapin.

Le 20/3/93 : même expérience avec le virus d'un chien tué en pleine rage furieuse. — 26/3 : le chat est paralysé, miaule d'une voix rauque, est abattu, mais regimbe quand on le touche avec une baguette. — 9/4 : paralysie chez le lapin.

Le 24/3/93 : même expérience avec la moelle d'un chien qui avait mordu diverses personnes. — 4/4 : paralysie chez le chat avec les symptômes ordinaires. — 10/4 : paralysie chez le lapin.

Le 26/3/93 : même expérience avec la moelle d'un chien suspect de rage. — 9/4 : paralysie du chat et du lapin.

Le 29/3/93 : même expérience avec la moelle d'un chien mort de rage furieuse. 10/4 : paralysie chez le lapin. — 12/4 : le chat est paralysé, refuse la nourriture, tente de mordre; miaulement avec la voix ordinaire.

Le 2/4/93 : même expérience avec la moelle d'un chien rabique. — 16/4 : paralysie chez le chat et chez le lapin.

Le 7/4/93 : même expérience. — 14/4 : paralysie chez le chat. — 22/4 : paralysie chez le lapin.

De ces expériences résulte que la paralysie est survenue :

en 12, 6, 11, 14, 14, 14, 7 jours chez le chat
en 17, 14, 17, 14, 12, 14, 15 jours chez le lapin.

Le virus de la rage des rues a donc évolué, 4 fois sur 7, plus vite chez le chat que chez le lapin, avec une différence de 5, 8, 6 et 8 jours[1]. Ce fait peut avoir quelque intérêt pour les Instituts de vaccination antirabique, lorsqu'il s'agit de savoir si un animal mordeur était ou non enragé. Le chat donne ce renseignement plus vite que le lapin.

II

COMMENT SE COMPORTE LE VIRUS DES RUES DANS LES PASSAGES SUCCESSIFS DE CHAT A CHAT?

Le 24/4/93, avec un virus de rue provenant d'un premier passage sur le lapin (paralysie le 16e jour), on inocule un chat roux pesant 1,300 grammes. Le 29/4, le chat est très agité et tente de se jeter sur qui l'approche. Le 30/4, on note les premiers symptômes de paralysie. Miaulement rauque caractéristique. Le 2/5, paralysie complète. Mort le 3/5. Poids 1,200 grammes. — On commence les passages en inoculant à chaque fois, sous la dure-mère, avec la moelle du chat mort, un nouveau chat et un lapin de contrôle. Nos résultats sont résumés dans le tableau suivant, qui, pour chaque passage, donne l'époque d'apparition de la paralysie (P.), le moment de la mort (M.). Les poids des animaux au moment de la trépanation et à celui de la mort sont inscrits entre parenthèses. Nous avons dit quel était le poids moyen de nos lapins ; la perte moyenne après inoculation est de 100 à 150 grammes, et ceci est dit une fois pour toutes.

Dates.	Numéro du passage.	Chat.	Lapin.
3/5/93	1er	Tigré (2,120 gr.). P. le 9. M. le 11 (1,650 gr.).	P. le 9. M. le 10.
11/5	2e	Roux (2,780 gr.). P. le 17. M. le 20 (2,220 gr.).	P. le 17. M. le 19.
20/5	3e	Noir (1,920 gr.). P. le 25. M. le 27 (1,500 gr.).	P. le 26. M. le 27.
27/5	4e	Noir (2,200 gr.). P. le 2/6. M. le 5 (1,750 gr.).	P. le 2/6. M. le 6.
5/6	5e	Blanc (2,090 gr.). P. le 10. M. le 12 (1,800 gr.).	P. le 10. M. le 11.
12/6	6e	Tigré (1,520 gr.). P. le 17. M. le 20 (1,250 gr.).	P. le 17. M. le 19.
20/6	7e	Noir (1,890 gr.). P. le 26. M. le 29 (1,415 gr.).	P. le 26. M. le 29.
29/6	8e	Blanc (2,250 gr.). P. le 5/7. M. le 8 (2,150 gr.).	P. le 5/7. M. le 6.
8/7	9e	Blanc (1,000 gr.). P. le 14. M. le 17 (810 gr.).	P. le 14. M. le 16.
17/7	10e	Roux (1,730 gr.). P. le 23. M. le 25 (1,570 gr.).	P. le 23. M. le 25.
26/7	11e	Noir (2,350 gr.). P. le 30. M. le 1/8 (1,870 gr.).	P. le 30. M. le 1/8.
1/8/93	12e	Noir (1,400 gr.). P. le 6. M. le 8 (1,280 gr.). Roux (1,670 gr.). P. le 7. Tué le 8 (1,410 gr.).	P. le 6. M. le 8.
8/8	13e	Tigré (1,980 gr.). P. le 14. M. le 17 (1,500 gr.). Blanc (1,770 gr.). P. le 14. Tué le 15 (1,530 gr.).	P. le 14. M. le 16.
15/8	14e	Bl. et n. (1,670 gr.). P. le 21. M. le 24 (1,570 gr.). Noir (2,270 gr.). P. le 21. Tué le 22 (1,900 gr.).	P. le 21. M. le 22.

1. On a observé la même avance de 4 à 5 jours dans deux cas d'inoculations multiples faites comparativement à un lapin et à un chat. Les inoculations avaient été faites sous la dure-mère et en outre aux membres postérieurs, pour éviter les morsures du chat, animal incommode à manier. C'est là peut-être la raison pour laquelle nous n'avons observé aucune diminution dans la durée d'incubation. Nous avons vu que la rapidité de propagation du virus augmente à mesure que diminue la distance de la lésion aux centres nerveux. (*Riforma medica*, avril 1889.)

Date.	Numéro du passage.	Chat.	Lapin.
22/8	15e	Roux (1,900 gr.). P. le 27. Tué le 29 (1,510 gr.).	P. le 27. M. le 29.
		Noir (1,830 gr.). P. le 27. Tué le 29 (1,730 gr.).	
29/8	16e	Noir (1,660 gr.). P. le 3/9. M. le 4 (1,100 gr.).	P. le 3/9. M. le 5.
		Tigré (1,820 gr.). P. le 3/9. Tué le 4 (1,610 gr.).	
4/9	17e	Roux (2,420 gr.). P. le 10. Tué le 11 (2,150 gr.).	P. le 10. M. le 11.
		Bl. et r. (3,550 gr.). P. le 10. Tué le 11 (2,800 gr.).	
11/9	18e	N. et r. (1,750 gr.). P. le 17. Tué le 18 (1,450 gr.).	P. le 17. M. le 19.
		Noir (2,920 gr.). P. le 17. Tué le 18 (2,310 gr.).	
18/9	19e	Tigré (1,560 gr.). P. le 23. Tué le 25 (1,760 gr.).	P. le 23. M. le 24.
		Blanc (2,180 gr.). P. le 24. Tué le 25 (1,430 gr.).	
25/9	20e	Bl. et n. (2,220 gr.). P. le 30. Tué le 2 (1,840 gr.).	P. le 30. M. le 2/10.
		Noir (2,650 gr.). P. le 30. Tué le 2 (2,300 gr.).	
2/10	21e	Blanc (1,900 gr.). P. le 7. Tué le 7 (1,615 gr.).	P. le 7. M. le 9.
		Roux (1,700 gr.). P. le 7. Tué le 7 (1,430 gr.).	
7/10	22e	Noir (1,350 gr.). P. le 14. Tué le 14 (1,110 gr.).	P. le 14. M. le 15.
		Roux (1,650 gr.). P. le 14. Tué le 14 (1,435 gr.).	
14/10	23e	Tigré (2,500 gr.). P. le 20. Tué le 20 (2,100 gr.).	P. le 20. M. le 21.
		Bl. et n. (1,550 gr.). P. le 20. Tué le 20 (1,160 gr.).	
20/10	24e	Roux (1,660 gr.). P. le 25. Tué le 28 (1,400 gr.).	P. le 26. M. le 28.
		Noir (2,800 gr.). P. le 26. Tué le 28 (2,300 gr.).	
28/10	25e	Tigré (1,800 gr.). P. le 2/11. Tué le 3 (1,620 gr.).	P. le 2/11. M. le 3.
		Blanc (3,000 gr.). P. le 2/11. Tué le 3 (2,430 gr.).	
3/11	26e	Roux (1,720 gr.). P. le 8. Tué le 9 (1,500 gr.).	P. le 8. M. le 10.
		Cendré (2,320 gr.). P. le 8. Tué le 9 (1,950 g..).	
9/11	27e	Noir (2,420 gr.). P. le 15. M. le 18 (2,100 gr.).	P. le 14. M. le 16.
		Tigré (1,350 gr.). P. le 14. Tué le 14 (1,120 gr.).	
14/11	28e	Blanc (1,750 gr.). P. le 20. Tué le 20 (1,460 gr.).	P. le 20. M. le 22.
		Roux (2,500 gr.). P. le 20. Tué le 20 (2,130 gr.).	
20/11	29e	Roux (1,800 gr.). P. le 26. Tué le 26 (1,450 gr.).	
		Cendré (1,965 gr.). P. le 26. Tué le 26 (1,720 gr.).	P. le 26. M. le 28.
26/11	30e	Blanc (1,810 gr.). P. le 1/12. Tué le 2 (1,500 gr.).	P. le 1. M. le 3.
		Roux (2,430 gr.). P. le 1/12. Tué le 2 (2,115 gr.).	
2/12	31e	Noir (1,823 gr.). P. le 8. Tué le 8 (1,610 gr.).	P. le 8. M. le 9.
		Blanc (2,350 gr.). P. le 8. Tué le 8 (1,945 gr.).	
8/12	32e	Cendré (1,640 gr.). P. le 14. Tué le 14 (1,250 gr.).	P. le 14. M. le 15.
		Blanc (1,720 gr.). P. le 14. Tué le 14 (1,436 gr.).	
14/12	33e	Roux (1,800 gr.). P. le 19. M. le 20 (1,465 gr.).	P. le 19. M. le 21.
		R. et n. (2,360 gr.). P. le 19. M. le 21 (2,100 gr.).	

A partir du 12e passage, pour éviter que la mort accidentelle d'un des chats ne vienne interrompre la série des inoculations, nous inoculons à chaque fois deux chats. Le passage a toujours été fait avec celui qui est marqué second au tableau.

En outre, avec le virus du 32e passage, on a inoculé un chien de moyenne grandeur qui, trépané le 8, a été pris de paralysie le 14 et est mort le 18. — Avec le virus du 33e passage, on a inoculé un chien qui a été pris de paralysie le 20 et est mort le 23.

Comme on le voit par toutes ces expériences, le virus des rues, par passages de chat à chat, atteint bientôt une période d'incubation de cinq à six jours, qu'il conserve après 33 passages, sans aucun symptôme d'atténuation.

Il est toujours transmissible au lapin, et aussi au chien, après

32 ou 33 passages, en conservant chez ces animaux la même virulence, c'est-à-dire en déterminant la rage après une période d'incubation de six jours, comme chez le chat.

III

COMMENT SE COMPORTE LE VIRUS FIXE DANS SES PASSAGES DE CHAT A CHAT?

Le 11/3/93, avec la moelle de la série du jour, on inocule un chat roux pesant 3,300 grammes. — Le 16/3. Paralysie avec les symptômes ordinaires, miaulement rauque, refus de nourriture et de boisson, abattement et phénomènes d'excitation quand on s'approche. — Mort le 18/3. Poids : 2,790 grammes. On commence une série de passages, résumés dans le tableau suivant :

Date.	Numéro du passage.	Chat.	Lapin.
18/3	1er	Blanc (2,850 gr.). P. le 24. M. le 27	(2,500 gr.). P. le 24. M. le 26.
27/3	2e	Noir (2,870 gr.). P. le 4/4. M. le 6	(2,580 gr.). P. le 4/4. M. le 6.
6/4	3e	Cendré (2,180 gr.). P. le 12. M. le 13	(1,840 gr.). P. le 12. M. le 13.
13/4	4e	Blanc (2,020 gr.). P. le 19. M. le 21	(1,580 gr.). P. le 19. M. le 20.
21/4	5e	Noir (1,880 gr.). P. le 28. M. le 1/5	(1,475 gr.). P. le 28. M. le 30.
1/5	6e	R.et bl. (1,920 gr.). P. le 7. M. le 8	(1,870 gr.). P. le 7. M. le 9.
8/5	7e	Roux (1,270 gr.). P. le 13. M. le 16	(1,000 gr.). P. le 13. M. le 15.
16/5	8e	Noir (1,850 gr.). P. le 22. M. le 25	(1,100 gr.). P. le 22. M. le 24.
25/5	9e	Blanc (1,740 gr.). P. le 2/6. M. le 5	(1,500 gr.). P. le 2/6. M. le 4.
5/6	10e	Blanc (1,480 gr.). P. le 11. M. le 13	(1,220 gr.). P. le 11. M. le 12.
13/6	11e	Tigré (1,400 gr.). P. le 19. M. le 22	(945 gr.). P. le 19. M. le 22.

La mort accidentelle du chat et du lapin inoculés au 12e passage a empêché de continuer les expériences, mais les résultats des essais précédents, et le fait que le virus a conservé aussi dans cette série sa période d'incubation, nous permettent de dire que le virus fixe ne subit aucune atténuation dans ses passages successifs de chat à chat.

IV

COMMENT SE COMPORTE, SUR LE CHAT, LE VIRUS FIXE ATTÉNUÉ, PAR COMPARAISON AVEC LE LAPIN?

Dans ces expériences nous nous sommes servis de moelles de lapin conservées 5, 4 et 3 jours.

Le 16/12, avec une moelle du 11, on inocule par trépanation un chat blanc qui est paralysé le 31, tué le 2 janvier 1894, et sert à inoculer un chat noir, qui est paralysé le 8. — Le même jour, 16/12, avec la même moelle de 5 jours, on inocule un lapin, qui résiste. Ceci confirme le fait signalé en 1888 [1], que la moelle de 5 jours des lapins de Palerme ne donne pas la rage au lapin.

Le 18/12, avec une moelle du 14, on inocule un chat qui montre des symptômes

1. *Relazione del 1o anno di vita della Staz. antirabbica di Palermo* (Celli e de Blasi) Palerme, 1888.

de paralysie le 29. Le 1er janvier, on fait un passage à un autre chat, qui montre de la paralysie le 12. Sa moelle, inoculée le 15 à un troisième chat, lui donne la paralysie le 21. — Le 18/12, avec la même moelle qui a servi au premier chat, on inocule un lapin, qui est paralysé le 24/1 1894. On fait ce jour-là un passage à un second lapin, qui est paralysé le 30.

Le 18/12, avec une moelle de 3 jours, on inocule un chat qui est paralysé le 25. La moelle est inoculée le 26 à un autre chat, paralysé le 31. — La même moelle de 3 jours sert à inoculer un lapin, qui est paralysé le 25. A un nouveau passage, la paralysie survient en 6 jours.

On voit par là que le virus atténué se renforce chez le chat à la première inoculation, tandis que chez le lapin c'est seulement au 2e passage.

La moelle de cinq jours a donné en quinze jours la rage au chat sans la donner au lapin. Celle de quatre jours a donné, en onze jours, la rage au chat, et seulement en trente-sept jours au lapin. La période d'incubation avec la moelle de trois jours a été de sept jours tant chez le chat que chez le lapin.

De ces expériences, nous croyons pouvoir tirer les conclusions suivantes :

Le virus rabique trouve, chez le chat, un terrain plus favorable que chez le lapin. Sa période d'incubation est presque toujours plus courte, et, quand il est atténué, il recouvre plus facilement sa virulence.

Le virus de la rage des rues, en passant de chat à chat, conserve sa virulence et acquiert très vite une période quasi fixe d'incubation, qu'on peut considérer comme plus courte que chez le lapin, si on tient compte de la différence de grandeur des animaux.

Le virus fixe ne subit aucune atténuation par passage sur le chat.

Si on tient compte, maintenant, de ce que le chat est, après le chien, l'animal domestique qui transmet, le plus souvent, la rage à l'homme, et que le virus rabique subit chez lui un renforcement, il n'est pas trop hardi de conclure, des expériences qui précèdent, que le chat est, peut-être, un des agents qui contribuent le plus à perpétuer la rage.

Palerme, février 1894.

FONDATION D'UNE STATION ANTIRABIQUE A TUNIS

PAR M. LE Dr A. LOIR.

Le gouvernement tunisien vient de décider la création d'une station antirabique annexée au Laboratoire de bactériologie de la Régence de Tunis. L'utilité de cette création ressort d'une façon indiscutable des chiffres que voici. Le nombre des personnes mordues en Tunisie, et qui sont allées à Paris pour se faire traiter, a été de :

Du 17 juin 1886 au 31 décembre 1887	13
En 1888	9
— 1889	5
— 1890	23
— 1891	21
— 1892	32
— 1893	37
Soit en tout	140 personnes.

De plus, la colonie italienne de la Régence envoie à l'Institut Pasteur de Palerme ses nationaux mordus par des chiens enragés. Les personnes qui vont ainsi en Sicile sont à peu près en nombre égal à celles qui vont à Paris.

Enfin, les Arabes n'acceptent qu'en très petit nombre de quitter la Tunisie pour se faire traiter. J'ai fait il y a trois mois l'autopsie d'un chien, mort avec des symptômes suspects, après avoir mordu trois femmes arabes, un chien et un chat. J'ai trouvé dans son estomac du bois, de la terre, des corps étrangers, et j'ai posé le diagnostic de rage, confirmé depuis par la mort en 23 jours d'un lapin inoculé dans la chambre antérieure de l'œil. Le chien et le chat mordus ont été abattus, mais il a été impossible de décider les trois femmes à quitter la Tunisie.

C'est ce qui arrive presque toujours, et il est intéressant de se demander ce que deviennent ainsi les Arabes abandonnés à eux-mêmes. Je dois à M. Roy, secrétaire général du gouvernement tunisien, une statistique du nombre des indigènes tunisiens, mordus par des chiens atteints ou suspects de rage, et qui ont refusé de se rendre à l'Institut Pasteur. Il y en a eu huit en 1891, quatre en 1892, onze en 1893, soit en tout vingt-trois. Sur ce nombre, le ministère a reçu avis de deux décès causés par la rage en 1892, de quatre en 1893, soit six en tout, tandis qu'il n'y en a eu aucun sur les cent quarante personnes du tableau ci-dessus, traitées à l'Institut Pasteur.

Les chiffres de cette petite statistique sont naturellement inférieurs à la réalité, car, d'une part, le gouvernement n'est averti, et n'insiste pour faire partir les mordus, que lorsque les morsures sont graves et que l'histoire du chien a fait événement dans le pays; de l'autre, il y a des morts rabiques qu'il ignore. La rage est très répandue en Tunisie, mais il est difficile de dire dans quelle mesure elle sévit, car son diagnostic n'est pas toujours facile à poser, lorsqu'on n'a pas, à portée, un laboratoire outillé pour des inoculations.

Voici un fait qui témoigne de l'embarras où on peut se trouver quelquefois pour poser un diagnostic rigoureux et prendre les responsabilités qu'il comporte.

Le 30 juillet, trois personnes sont mordues par un chien connu, n'ayant présenté jusqu'alors aucun symptôme de rage : on cautérise les blessures avec de l'acide phénique à 50 0/0. Le lendemain, l'autopsie du chien, qu'on avait assommé, conclut à l'absence de signes de rage.

Le 19 août, l'un des mordus meurt de rage. Les deux autres partent de suite pour l'Institut Pasteur. Depuis, rien de nouveau de ce côté.

Mais, le 18 août, un individu est blessé à la main par les dents d'un chien malade, dont il essayait d'écarter les mâchoires pour lui faire absorber de l'huile de ricin. Le 19 au matin, ce chien donne des signes de rage ; il est abattu en même temps que deux autres chiens et un chat qu'il venait de mordre, et on apprend alors qu'il avait été lui-même mordu le 30 juillet par le chien dont nous venons de parler. L'individu blessé à la main a subi le traitement antirabique et va toujours bien, mais on

aurait pu éviter ces répercussions et la mort de l'un des mordus si on avait eu à Tunis un laboratoire permettant d'affirmer, par les résultats de l'inoculation, un état de rage que l'autopsie avait dû laisser douteux, et de commencer les vaccinations antirabiques sur place en attendant le résultat de l'inoculation du bulbe de l'animal suspect.

REVUES ET ANALYSES

E. Klein, Etiologie de la dipthérie, 20th *annual Report*, 1892.

Dans le numéro de novembre 1893 de ces *Annales*, nous avons signalé la contradiction qui existait entre M. Klein et M. Abbott sur les résultats de l'inoculation à la vache du bacille de la diphtérie humaine. M. Klein avait conclu de ses expériences que la vache ainsi inoculée pouvait présenter sur ses mamelles des lésions capables de devenir la source d'une contagion nouvelle, et que son lait pouvait aussi contenir des bacilles diphtéritiques dangereux. Tout en s'accordant avec M. Klein au sujet de la maladie interne que subissait sa vache inoculée, M. Abbott n'avait réussi à observer ni l'éruption sur la mamelle, ni le passage des bacilles dans le lait, et ses expériences diminuaient ainsi la portée pratique des constatations de M. Klein. Je disais, à ce propos, qu'il était prudent de ne prendre parti ni pour l'un ni pour l'autre de ces savants, attendu qu'ils pouvaient avoir raison tous les deux, le passage des bacilles dans le lait restant toujours possible, s'il n'était pas toujours réalisé.

Un travail nouveau de M. Klein, que je ne connaissais pas quand j'écrivais mon compte rendu, est tout à fait en faveur de cette opinion, car il montre que si l'éruption sur la mamelle et le passage des bacilles dans le lait ne sont pas chose rare, ils ne sont pourtant pas des phénomènes constants. Ainsi deux vaches, inoculées avec une culture de bacille diphtéritique dérivée d'une vache morte à la suite d'une inoculation du bacille de la diphtérie humaine, sont mortes toutes deux avec de graves désordres internes, mais sans présenter d'éruption sur les tétines, et sans que les bacilles aient passé dans le lait. Par contre, deux vaches, inoculées de la même façon avec un bacille un peu atténué par une longue culture sur gélose, se sont rapidement rétablies, mais toujours sans présenter d'éruption sur les mamelles ni de bacilles dans leur lait. Dans une autre série d'expériences, au contraire, on a observé des ulcères sur les pis, et le lait de la même vache a présenté tantôt des bacilles et tantôt pas. Le danger d'une contamination par le lait provenant de ces vaches malades est donc, il semble, moins grand qu'on n'aurait pu le craindre d'après les premiers résultats de M. Klein

et, là aussi, il faut sans doute compter avec le degré de virulence du microbe, si variable, comme on sait, chez le bacille de la diphtérie.

Mais, ces réserves faites, il faut se dire aussi que les faits positifs du passage du bacille dans le lait sont d'un poids bien plus grand que les faits négatifs. De ce qu'on n'est pas toujours écrasé par un omnibus, il ne faut pas conclure qu'il n'y a pas à s'en garer, et, précisément dans ce même travail, M. Klein cite deux cas dans lesquels, en allant visiter une vacherie dont le lait était accusé d'avoir semé la diphtérie dans sa clientèle, on a trouvé, sur les pis des vaches laitières, des papules et des ulcères tout à fait analogues à ceux qu'on trouvait sur les mamelles des vaches inoculées avec le bacille de la diphtérie humaine. Dans la symbiose qui s'est établie entre les animaux domestiques et nous, il y a, comme dans toutes les symbioses, un échange constant de bons et de mauvais services. La vache nous sert et nous nuit. Dans cet ordre d'idées, et toujours à propos de la diphtérie, nous trouverions dans le travail de M. Klein de quoi faire aussi le procès des chats. Mais il ne faut pas se brouiller à la fois avec tous ses amis, surtout quand on s'est déjà aliéné les perruches.

Dx.

Fr. Elfving. Sur l'irritabilité des plantes. *Ofv. af Finska Vet. Soc. Forhandlingar.*

Les lecteurs des *Annales* n'ont pas perdu le souvenir d'un curieux travail (T. V, p. 101) dans lequel M. Elfving montrait que les tubes sporangifères du *Phycomyces nitens* s'inclinent vers un morceau de fer ou d'acier placé dans leur voisinage, tandis que le voisinage d'une plaque de cuivre les laisse indifférents. Un certain nombre de corps, la cire à cacheter, la colophane, la soie, le caoutchouc, le bois, le soufre agissent comme le fer, et au milieu de cette variété de corps actifs, on ne voit pas de propriété commune à laquelle on pourrait rattacher l'effet produit. M. Elfving n'avait pas hasardé d'explication, tout en inclinant à voir dans le phénomène une sorte d'effet d'irradiation, en relation avec la structure interne des corps actifs.

A la réunion qu'a tenue à Édimbourg, en 1892, l'Association britannique, et dans le tome VI des *Annales de botanique*, M. L. Errera a attribué le fait à une espèce d'hydrotropisme. Le *Phycomyces nitens* fuit, comme on sait, les surfaces humides. Si on admet que le fer diminue l'état hygrométrique à son voisinage, les sporanges de la plante subiront de son côté une attraction apparente qui sera une répulsion réelle du côté opposé. Mais le fer n'est guère hygrométrique.

Une lame de fer de 4,950 millimètres carrés de surface n'a pris, dans une expérience de M. Elfving, que 3 mg. 5 d'eau en 24 heures dans une atmosphère saturée. D'un autre côté, des bâtons ou des plaques de substances très hygrométriques, de potasse, de chlorure de calcium, sont sans action sur le *Phycomyces*. Il faut donc renoncer à cette explication.

Voici, du reste, des faits nouveaux qui, s'ils ne donnent pas l'explication du phénomène, semblent au moins le faire revenir dans la région où M. Elfving l'avait placé tout d'abord, dans celle des phénomènes de radiations ou de vibrations moléculaires. Le platine est un métal inactif sur le *Phycomyces*. Exposé au soleil, il devient actif. Cette faculté se manifeste tant du côté éclairé que de l'autre. Elle dure quelques heures, puis elle disparaît.

M. Elfving voit là une sorte de phosphorescence, faite de rayons invisibles pour nous, mais auxquels la plante est sensible. Il rappelle, à ce sujet, que dans ses belles études sur la phosphorescence, E. Becquerel avait dit : « Même si les corps ne sont pas lumineux dans le phosphoroscope, on ne peut dire qu'il n'existe aucun effet après l'action du rayonnement, car la lumière pourrait exciter des vibrations d'une autre vitesse que celles qui sont perceptibles à nos yeux (et, en général, plus lentes), et capables de donner lieu, soit à des effets de chaleur, soit à d'autres actions moléculaires encore inconnues ».

C'est une indication : ce n'est pas encore une explication, et, pour le moment, il n'y a qu'à recueillir des faits. C'est à quoi s'applique M. Elfving. Il a vu, par exemple, que 70 minutes d'insolation à un vif soleil du mois d'août suffisaient à rendre active une plaque que cinq heures d'exposition à un temps couvert laissaient inerte. On ne saurait pourtant voir là un effet calorifique, car la plaque restait inactive après avoir été chauffée pendant des heures à la température qu'elle atteignait au soleil. D'un autre côté, les rayons ultraviolets n'ont pas d'action prépondérante, car la lumière conserve son action même lorsqu'on la filtre à travers une solution de sulfate de quinine. Il faut donc, au moins jusqu'ici, renoncer à une explication d'ordre chimique.

La chaleur, qui est sans action sur le platine, en a une sur le zinc. Un bâton de zinc chauffé au chalumeau jusqu'à commencement de fusion, et laissé ensuite refroidir jusqu'à ce qu'aucune chaleur ne fût sensible à la main, a donné en quelques heures, au *Phycomyces*, les plus belles courbures qu'on puisse voir. Après quelques heures, ce même bâton était devenu inactif. Au contraire le platine, le cuivre, le cobalt, le nickel, l'étain, le plomb et le verre sont toujours inactifs, à quelque degré qu'on les chauffe.

Tout cela est curieux, comme tout ce qui avoisine cette région un peu mystérieuse des effets à distance, autour de laquelle on a tourné sans y mettre encore franchement le pied. Qu'il y ait dans le mesmérisme, dans le braidisme, dans la suggestion, dans la métallothérapie, des faits exacts, c'est ce dont personne ne doute; que les réalités y soient mélangées à des visions pures, c'est ce qu'il est impossible de contester. Le difficile est de démêler les illusions des réalités, de faire la part de l'*emballement* du médecin et de la rouerie consciente ou inconsciente du sujet. Si on trouvait des plantes hypnotisables, elles seraient bien préférables à l'homme, qui est également redoutable comme sujet d'expériences, qu'il soit intelligent ou qu'il ne le soit pas.

Dx.

INSTITUT PASTEUR

Personnes prises de rage au cours du traitement.

Nemesio Ollero, 52 ans, de Debicho, province de Cordoue, Espagne. Mordu le 15 décembre 1893, par un chien reconnu enragé après examen vétérinaire : traité à l'Institut Pasteur depuis le 26 décembre.

Les morsures au nombre de trois étaient situées sur la lèvre supérieure et sur la joue gauche : elles n'avaient subi aucune cautérisation. Les premiers symptômes rabiques se sont manifestés le 2 janvier : transporté à l'hôpital Necker, Ollero y est mort le 5 janvier.

Ramon Francesca née Carbonnell, 53 ans, de Pozzo-Blanco, province de Cordoue, Espagne.

Mordue le 18 décembre 1893, par le même chien que Ollero, traitée à l'Institut Pasteur à partir du 5 janvier.

Les morsures au nombre de six étaient situées sur les deux faces de la région métacarpienne de la main droite : elles étaient très pénétrantes, en deux endroits la main avait été transpercée; une cautérisation au fer rouge avait été pratiquée une heure après l'accident.

Le 23 janvier, F. Carbonnel se plaint de démangeaisons dans la main mordue. L'appétit a disparu depuis plusieurs jours : le lendemain les symptômes s'aggravent, la malade est conduite à l'hôpital Necker, elle y meurt le 26 janvier.

10 autres personnes très gravement mordues par le même chien et traitées à l'Institut Pasteur sont actuellement en bonne santé.

Sceaux. — Imp. Charaire et Cie.

Fig. 1

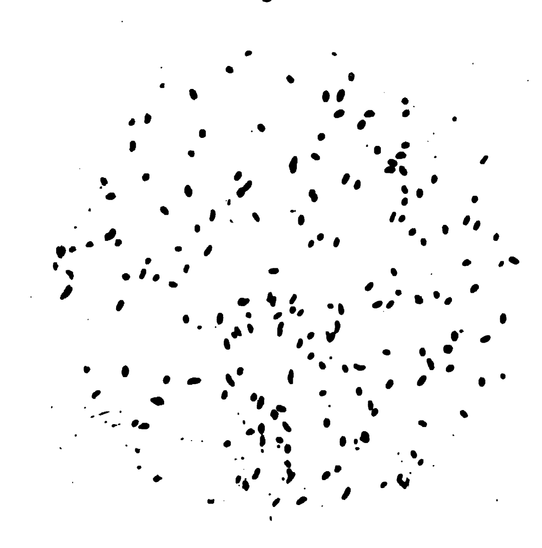


Fig. 2



Glyptographie SILVESTRE & Cie.

8me ANNÉE JUIN 1894. N° 6.

ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

ÉTUDES SUR LA FIÈVRE TYPHOÏDE EXPÉRIMENTALE

PAR LE Dr GIUSEPPE SANARELLI

Docent d'Hygiène (Rome)

(Travail du Laboratoire de M. E. Metchnikoff à l'Institut Pasteur.)

3e MÉMOIRE

I

L'ACCOUTUMANCE INTESTINALE AU POISON TYPHIQUE DANS LA FIÈVRE TYPHOIDE HUMAINE

Les étroites analogies que j'ai signalées entre la fièvre typhoïde humaine et celle des laboratoires ont mis en évidence les notes prédominantes, communes à ces deux formes morbides, savoir : les lésions toxiques de l'appareil digestif [1].

Toutefois, dans aucune de ces fièvres, ce processus intestinal ne représente le point de départ, ni une localisation du virus typhique. Il doit être considéré seulement comme une complication aggravante, qui peut même devenir le fait prédominant de la maladie, lorsque celle-ci est de longue durée, comme chez l'homme.

Nous avons vu, en effet, que l'entérite aiguë qui, chez les animaux, se termine par la desquamation de l'épithélium intestinal, par l'infiltration des follicules lymphatiques, par l'extraordinaire multiplication des microbes intestinaux, et qui, chez l'homme, à cause de la durée plus longue de la période fébrile

1. Voir *Annales de l'Institut Pasteur*, n° 11, 1892, et n° 4, 1894.

et, par conséquent, de l'intoxication, peut finir par l'ulcération (nécrose toxique) des plaques de Peyer, n'est que la conséquence d'une action élective, spécifique, de la toxine typhique, sur la muqueuse de l'appareil digestif.

La présence des bacilles d'Eberth n'a donc rien de commun avec les phénomènes si complexes et si caractéristiques qui se développent le long du tube intestinal. Ces bacilles peuvent agir de loin et en vertu de leur poison, qu'ils se trouvent localisés de préférence dans les séreuses, comme chez les animaux, ou dans la rate, comme chez l'homme.

C'est pourquoi nous devons considérer la fièvre typhoïde comme une infection du système lymphatique, à la toxine de laquelle les muqueuses en général, et les muqueuses intestinales en particulier, réagissent de la même manière que le tégument cutané dans le cours de quelques maladies exanthématiques, comme la variole, la rougeole et la scarlatine.

Il arrive même que dans ces maladies, comme aussi dans l'érysipèle, la pyohémie, etc., on rencontre souvent quelques lésions intestinales dont l'analogie avec les lésions de la fièvre typhoïde est telle que l'on a pu croire autrefois à la connexité de ces diverses affections [1].

D'autre part on sait que, dans la fièvre typhoïde humaine, il n'y a aucun rapport entre l'extension des lésions intestinales et la gravité des symptômes cérébraux ou abdominaux, tels que l'intensité de la diarrhée.

Enfin, la diarrhée et les lésions intestinales ne font pas invariablement partie du tableau clinique et anatomo-pathologique de la fièvre typhoïde ; sur 100 cas observés par *Murchison*, on en trouva 7 dans lesquels les symptômes intestinaux n'apparurent à aucune période, et 4 qui, malgré la constipation préexistante, eurent des suites mortelles.

Ces considérations nous ramènent de quelques pas en arrière dans l'histoire étiologique si controversée de la fièvre typhoïde, et nous expliquent, en grande partie, qu'une symptomatologie si protéiforme ait pu rendre possible, pendant longtemps, la création d'un nombre infini de dénominations et d'entités nosologiques distinctes.

1. Voir C. Murchison, *La fièvre typhoïde* (Trad. par Guéneau de Mussy), Paris, 1878, p. 248.

La découverte du bacille d'Eberth a eu le grand mérite de grouper et d'identifier toutes ces formes morbides; mais, d'autre part, elle a eu le désavantage de fausser un peu l'exacte interprétation de ce processus à la fois toxique et infectieux, entrevue depuis longtemps par *Petit* et *Serres* [1], et ensuite spécialement mise en lumière par *Trousseau*.

Désormais la fièvre typhoïde ne peut pas plus être considérée comme une maladie de l'intestin, que la variole comme une maladie de la peau. L'exanthème intestinal de l'une et l'exanthème cutané de l'autre ne représentent ni le siège du virus, ni ce qu'on appelle l'*essence* de la maladie; lorsqu'ils se manifestent avec une gravité insolite, ils en constituent seulement la complication la plus redoutable.

Mais de ce que, au point de vue clinique, ces complications peuvent être insignifiantes ou nulles, il faut conclure que, dans la fièvre typhoïde humaine, la réaction intestinale au poison typhique, qui se montre indépendante de la gravité plus ou moins grande du processus infectieux, peut être liée à des conditions tout à fait particulières de la muqueuse intestinale.

Ces conditions anatomiques ou fonctionnelles de la tolérance vis-à-vis d'un poison si actif, dans d'autres cas, sur toutes les muqueuses, méritent d'être étudiées et, s'il est possible, expérimentalement reproduites.

Nous trouvons quelques observations, de nature à nous diriger dans cette nouvelle voie, chez les auteurs qui ont traité, avec compétence, de la *rechute* qui se produit quelques jours après la convalescence d'une fièvre typhoïde, et peut finir par la mort.

Dans ce cas on trouve, à l'autopsie, non seulement que *les seules glandes intestinales frappées sont précisément celles qui ont échappé à la première attaque*, mais que *les lésions mêmes de la rechute sont moins étendues que celles du processus précédent* [2]. *Trousseau* va même jusqu'à nier que, dans les rechutes, les lésions caractéristiques de l'intestin puissent se renouveler [3].

1. *Traité de la fièvre entéro-mésentérique*, Paris, 1813. (... Les lésions morbides de l'intestin résultent de l'introduction d'un poison dans l'économie et sont d'une nature éruptive comme les pustules de la variole..., p. 159, 165 et introd., p. 20, 39.)

2. Murchison, *Ibid.*, p. 163.

3. Trousseau, *Clinique médicale de l'Hôtel-Dieu*, 1861, p. 158. (... Quoique l'appareil symptomatique soit très complet, quoique l'éruption cutanée se reproduise, la lésion caractéristique de l'intestin ne se renouvelle pas....)

Ces faits démontrent d'une manière assez évidente que la muqueuse intestinale, après avoir subi une première fois l'action du poison typhique, *peut* tolérer impunément une seconde attaque, même mortelle, de la maladie, et manifester, comme *acquise*, cette espèce d'immunité pour le poison typhique, que, dans une première attaque, on est parfois contraint de considérer comme *naturelle* (fièvre typhoïde sans lésions intestinales).

Si l'on considère ensuite que, dans les *rechutes*, malgré l'absence ou la bénignité des lésions intestinales, la maladie générale peut se développer de la manière la plus grave, parce que l'immunité vaccinale n'a pas encore eu le temps nécessaire pour s'établir, on aura encore un nouvel argument en faveur de la nature exclusivement toxique des altérations intestinales dans la fièvre typhoïde.

Étudions maintenant la nature de cette tolérance acquise par les parois intestinales pour la toxine typhique.

Puisqu'on peut exclure, même *a priori*, la possibilité d'une vaccination locale, soit parce que la muqueuse intestinale n'offre, d'ordinaire, aucune localisation du virus, soit parce qu'une vaccination locale ne s'expliquerait pas avec l'état de réceptivité générale à la nouvelle infection, il ne reste d'admissible que l'hypothèse suivant laquelle il s'agirait d'une *accoutumance* spéciale de l'intestin aux produits toxiques du bacille d'Eberth.

Cette *accoutumance* d'une catégorie déterminée d'éléments cellulaires aux poisons microbiens a déjà été signalée d'une manière générale, à plusieurs reprises, par *Metchnikoff*, et confirmée par des recherches ultérieures de *De Bary* [1] et de *Metchnikoff* et *Roudenko* [2].

Pour ce qui concerne la toxine du bacille typhique, déjà dès 1887 *Beumer* [3] démontra que l'injection répétée de cultures stérilisées du bacille d'Eberth rend les rats réfractaires aux doses mortelles de cette toxine.

Dans mes premières recherches sur la vaccination contre la fièvre typhoïde expérimentale [4], j'ai également démontré que les cobayes guéris spontanément, mais non encore devenus

1. Vorlesungen uber Bakterien, 1885, p. 109.
2. Recherches sur l'accoutumance aux produits microbiens (*Ann. de l'Institut Pasteur*, 1891, p. 567).
3. Der derzeitige Standpunkt der Schutzimpfungen, 1887, p. 4.
4. *Loc. cit.*, p. 745, 1892.

réfractaires au virus typhique, pouvaient supporter impunément des doses de liquide vaccinal qui, chez d'autres cobayes, étaient capables de produire un amaigrissement excessif et même la mort.

Puisque, comme nous le verrons plus tard, ces phénomènes ne peuvent être attribués à aucune propriété antitoxique de l'organisme normal ou vacciné, on doit, nécessairement, les considérer comme étant dus à l'accoutumance des cellules.

Mais, dans ces derniers cas, il s'agit évidemment d'un phénomène général, en vertu duquel les cellules de l'organisme, surtout les leucocytes, deviennent insensibles à l'influence des poisons, d'où il résulte que, au lieu d'en être repoussés, ils se dirigent vers eux, englobent les microbes, les empêchent de produire de nouveau poison et enfin les tuent.

Dans l'immunité naturelle ou acquise de l'intestin dans la fièvre typhoïde humaine, on constate, au contraire, le cas très singulier d'une *accoutumance* locale qui, jusqu'à présent, n'a été signalée ni étudiée par personne.

Ici, le poison typhique se produit et exerce son action toxique générale en agissant sur les centres nerveux, déterminant la réaction fébrile typique de la maladie, occasionnant même la mort, mais respectant précisément les organes et les cellules qui, par l'importance de leurs réactions, représentent souvent le symptôme le plus grave de la fièvre typhoïde chez l'homme.

II

L'ACCOUTUMANCE INTESTINALE AU POISON TYPHIQUE DANS LA FIÈVRE TYPHOÏDE EXPÉRIMENTALE

Une circonstance très remarquable, qui fait espérer qu'on pourra supprimer, chez les animaux, la violente réaction intestinale de la fièvre typhoïde expérimentale, se présente chaque fois qu'on fait l'autopsie d'un cobaye mort pendant ou peu après la vaccination.

Quelquefois ces animaux, très sensibles à la toxine typhique, meurent après les premières injections du liquide vaccinal; d'autres fois, au contraire, c'est après la période de la vaccination, par l'effet d'un véritable empoisonnement chronique.

Dans ce dernier cas, l'intestin de ces animaux apparaît tout à fait normal. Cela fait supposer que les parois de ce canal, après avoir subi graduellement l'influence du poison typhique pendant la vaccination, ont acquis le degré d'accoutumance nécessaire pour une immunité locale, sans modifier en rien la réceptivité générale.

Ces résultats font un singulier contraste avec ceux que l'on observe lorsque les animaux succombent par l'effet d'une vaccination trop précipitée, par des doses ou trop élevées, ou trop rapprochées l'une de l'autre.

Dans ces cas, l'intestin présente toujours les signes manifestes d'un processus réactionnel plus ou moins accentué; l'émigration des microbes intestinaux, que j'ai eu l'occasion de mentionner dans mon précédent mémoire, reste même favorisée.

Comme l'intestin des cobayes réagit mieux que celui de tous les autres animaux à la présence du poison typhique dans l'organisme, il était naturel de le préférer dans les recherches actuelles.

Mes tentatives pour obtenir à volonté une accoutumance intestinale régulière au poison typhique se heurtèrent d'abord à quelques difficultés, dues à l'introduction inévitable de la toxine dans l'organisme. Ce dernier reste plus ou moins bien vacciné, et l'inoculation ultérieure du virus n'est pas suivie de l'infection générale si typique que j'ai décrite, à plusieurs reprises, chez le cobaye.

Mais, après un certain nombre d'essais, je suis enfin arrivé à trouver un moyen aussi simple que sûr pour atteindre le but que je m'étais proposé.

En injectant dans l'estomac des cobayes, dans le cours de quelques jours, la quantité de cultures typhiques stérilisées qui aurait été suffisante pour les vacciner solidement, et dans la même période de temps, si on la leur eût injectée sous la peau, on obtient une accoutumance de l'intestin à la toxine du bacille d'Eberth, sans modifier en rien la réceptivité des cobayes à l'infection générale produite par l'inoculation ultérieure du virus.

Dans mes recherches je procédais de la manière suivante :

Après avoir fait deux lots de cobayes, je leur administrais

chaque jour, et 5 jours de suite, 4 c. c. d'une culture de bacilles typhiques en bouillon glycériné, resté pendant un mois dans l'étuve à 37° et ensuite stérilisé à 120°.

Pour le premier lot, on introduisait le liquide vaccinal dans l'estomac, au moyen d'une petite sonde ; pour le second, on l'inoculait directement sous la peau, comme cela se pratique pour les vaccinations ordinaires (voir appendice n° 1).

Lorsqu'on connaît le pouvoir immunisant des liquides vaccinaux qu'on emploie, on peut interrompre le traitement après une période déterminée ; mais, en cas contraire, la seconde série d'animaux pourra toujours indiquer à quelle dose le liquide vaccinal atteint sa limite exacte d'efficacité.

Les miens immunisaient les cobayes à des doses même inférieures à 20 c. c, mais j'administrais d'ordinaire cette quantité, car quelques cobayes du lot inoculé sous la peau finissaient toujours par mourir, et cela me démontrait, mieux que toute autre inoculation d'essai faite avec le virus, que la dose vaccinante du liquide administré avait été atteinte, et que la limite de tolérance commençait à être dépassée. Après avoir terminé, de cette manière, la préparation des animaux, on les pesait de nouveau, et on trouvait, régulièrement, que ceux de la première série avaient perdu bien peu de leur poids initial, peut-être autant par l'effet de la courte diète qu'on leur imposait une quinzaine d'heures avant l'injection gastrique, pour qu'elle trouvât l'estomac vide, que par l'effet de cette injection elle-même. Au contraire, les cobayes du second lot avaient beaucoup maigri, comme on l'observe toujours après chaque vaccination excessivement prolongée.

Bien que ce poison versé dans l'estomac semble passer sans être mis en évidence par un réactif aussi sensible que l'est celui de la vaccination et de l'amaigrissement, il rend cependant les parois intestinales incapables de toute réaction, même lorsque le virus typhique fabrique sa toxine dans l'organisme, comme dans la fièvre typhoïde expérimentale.

En effet, les cobayes qui ont reçu le poison typhique par voie gastrique, lorsqu'ils sont inoculés dans le péritoine, même avec de petites doses d'une culture virulente du bacille d'Eberth, meurent en 8, 12, 24 heures, exactement comme les cobayes de contrôle, inoculés en même temps, mais sans présenter ni ce

fort météorisme ni cette excessive sensibilité abdominale qui, chez les cobayes neufs, représentent les symptômes objectifs les plus marqués de l'infection et de l'intoxication typhiques : le facies de la maladie est changé, et il en est de même des résultats de l'examen anatomique.

La cavité péritonéale est presque toujours privée d'exsudat liquide ; les masses intestinales sont pâles, brunâtres, sèches : aucune trace des processus congestifs ordinaires. Leur surface est sillonnée par les mailles d'un exsudat fibrino-purulent, constitué par une quantité énorme de bacilles typhiques et de leucocytes.

Le contenu intestinal est, généralement, visqueux et privé entièrement de ces amas d'éléments cellulaires de toute nature qui caractérisent l'entérite typhique aiguë ordinaire.

La rate est habituellement petite et flasque ; l'utérus, au contraire, est souvent un peu congestionné.

Dans le tableau suivant, je rapporte sommairement, les unes en face des autres, les notes les plus caractéristiques de deux infections obtenues : la première chez un cobaye neuf et la deuxième chez un cobaye ayant l'intestin accoutumé au poison typhique.

Je n'y indique que les caractères typiques, car dans l'accoutumance intestinale au poison typhique il peut y avoir de petites variations comme dans la fièvre typhoïde expérimentale.

EXPÉRIENCES COMPARATIVES SUR L'ACCOUTUMANCE DE L'INTESTIN AU POISON TYPHIQUE DANS LA FIÈVRE TYPHOIDE EXPÉRIMENTALE

HEURES	11. VII. COBAYE NEUF (gr. 310).	HEURES	11. VII. COBAYE AVEC INTESTIN ACCOUTUMÉ AU POISON (gr. 340).
8	Injection intrapéritonéale de 0cmc,5 d'une culture en bouillon virulente.	8	Injection intrapéritonéale de 0cmc,5 d'une culture en bouillon virulente.
	SYMPTOMATOLOGIE		SYMPTOMATOLOGIE
	Fort météorisme abdominal, accompagné d'excessive sensibilité douloureuse.		Aucun météorisme abdominal, avec absence complète de sensibilité douloureuse.
22	Mort après 14 heures.	20	Mort après 12 heures.
	EXAMEN ANATOMIQUE		EXAMEN ANATOMIQUE
	Cavité péritonéale : exsudat liquide, hémorragique, très riche en microbes et presque privé de cellules, congestion très forte de toute la séreuse.		*Cavité péritonéale :* absence d'exsudat liquide, aspect très pâle de toute la séreuse abdominale, plusieurs flocons fibrino-purulents entre les anses intestinales.
	Intestins : excessivement congestionnés et ecchymotiques, les parois sont dilatées et flasques, les glandes lymphatiques grossies et congestionnées, la muqueuse est détruite, le contenu entérique est abondant, diarrhéique et hémorrhagique.		*Intestins :* parfaitement normaux, secs, anémiques; muqueuse intacte, contenu entérique normal.
	Rate : un peu grossie.		*Rate :* un peu grossie.
	Utérus : très congestionné.		*Utérus :* un peu congestionné.

Le phénomène de l'accoutumance intestinale au poison typhique, chez le cobaye de la deuxième expérience, apparaît donc très évident, c'est pourquoi je crois inutile d'insister plus longuement sur les particularités qui l'accompagnent.

Le but désiré, c'est-à-dire de rendre insensible à la toxine du bacille d'Eberth, cet organe qui, dans la fièvre typhoïde humaine et expérimentale, reste le plus gravement frappé, est donc expérimentalement atteint, et s'il n'est pas encore possible d'indiquer le processus biologique du phénomène, on peut, pourtant, supposer qu'il doit se développer et s'accomplir dans les cellules

et dans les organes de l'intestin qui, d'ordinaire, réagissent et se montrent sensibles à l'influence du poison typhique, c'est-à-dire dans les lymphocytes, dans les follicules lymphatiques et peut-être aussi dans l'épithélium intestinal lui-même.

III

LA NATURE DE L'ACCOUTUMANCE INTESTINALE AU POISON TYPHIQUE

J'ai désigné jusqu'ici, sous le nom d'*accoutumance intestinale*, la faculté qu'ont les parois intestinales de rester insensibles au poison typhique, en la prenant comme un fait. Resterait maintenant à savoir de quoi elle dépend.

J'ai déjà démontré que les cultures stérilisées du bacille typhique vaccinent aussi l'organisme contre l'infection par le *B. coli*.

En outre, bien que j'aie déjà cherché à exclure cette hypothèse, on peut se demander si les lésions intestinales de l'infection ou de l'intoxication typhique ne dépendent pas plutôt de l'action du *B. coli* intestinal lui-même, devenu tout à coup virulent, que de celle du poison spécifique. Dans ce cas, on pourrait admettre que l'injection gastrique du poison typhique détermine la vaccination et non l'accoutumance des cellules intestinales. La conséquence de cette vaccination locale serait l'immunité intestinale contre l'action pathologique du *B. coli*.

Enfin, il reste encore à décider une seconde question. Étant admis que l'immunité des parois intestinales, dans la fièvre typhoïde expérimentale, fût l'effet, non d'une vaccination locale contre le *B. coli*, mais d'une simple accoutumance au poison typhique, quelle était la nature de cette accoutumance ? Est-elle le résultat d'une action spécifique, exclusivement propre au poison du bacille d'Eberth, ou bien doit-on la regarder comme un phénomène général, commun à tous les poisons microbiens ?

Pour répondre à ces deux questions, il fallait trouver des poisons microbiens qui, introduits dans l'organisme, ne vaccinent ni contre le bacille typhique, ni contre le *B. coli*, mais, cependant, accoutument l'intestin à tolérer impunément la toxine du bacille d'Eberth.

Je suis arrivé à ce résultat en me servant d'une macération

de 330 grammes de viande de bœuf, finement triturée, dans un litre d'eau, abandonnée vingt-cinq jours dans une étuve à 37°. Au bout de ce temps, j'ai trouvé, surnageant le dépôt, un liquide très limpide, d'une odeur excessivement désagréable et pénétrante, qui a été filtré et stérilisé à 120°.

Je choisis alors huit cobayes de grosse taille, et je les soumis journellement à l'inoculation sous-cutanée, à doses toujours croissantes, de ce liquide, expérimentant d'abord le pouvoir toxique, qui m'apparut immédiatement très faible (voir appendice n° 2).

En effet, bien que chacun de ces cobayes, dans l'espace de quinze jours, eût reçu, sous la peau, 30 c. c. de ce liquide, on eut une diminution de poids très inférieure à celle qui se serait produite à la suite de l'injection du poison typhique.

Les cobayes préparés de cette manière n'avaient acquis aucune immunité, ni contre la fièvre typhoïde expérimentale, ni contre l'infection déterminée par le B. coli; mais ils avaient acquis l'accoutumance intestinale classique contre le poison typhique.

L'inoculation intra-péritonéale des bacilles d'Eberth tuait, en effet, ces animaux accoutumés, dans le même espace de temps, avec la même diffusion des microbes dans l'organisme que chez les animaux de contrôle. Par contre, il y avait tout aussi peu de traces de réaction inflammatoire de la part de l'intestin que chez les cobayes préparés au moyen de l'ingestion gastrique de la toxine typhique.

Dans ce cas, il ne pouvait donc s'agir ni d'une vaccination locale, ni d'une accoutumance spécifique à un poison de la même nature. Le poison putride, inoculé sous la peau, s'était peu à peu éliminé par la surface intestinale, ou, du moins, il avait agi si activement sur elle qu'il en avait rendu les éléments complètement insensibles à l'action d'un poison beaucoup plus actif, tel que celui du bacille d'Eberth.

L'accoutumance intestinale au poison typhique ne peut par conséquent être considérée comme un phénomène particulier à ce poison. Évidemment, les parois intestinales réagissent d'autant moins à l'influence des poisons microbiens qu'elles sont plus habituées à les éliminer ou à en subir l'action.

L'accoutumance intestinale contre la fièvre typhoïde, obtenue avec les poisons de la fermentation putride, en constitue l'exemple expérimental le plus remarquable.

L'accoutumance intestinale obtenue avec les injections gastriques de toxines typhiques est de courte durée; déjà au bout de dix, quinze jours, les cobayes inoculés et qui meurent d'infection typhoïde, commencent à présenter de nouveau tous les viscères abdominaux un peu congestionnés. L'accoutumance obtenue avec les inoculations de poisons putrides se maintient, au contraire, plus longtemps, et semble beaucoup plus stable et plus complète, tout en restant naturellement liée à la quantité des poisons introduits et à la durée de la période préparatoire.

Mais il y a une autre particularité concernant précisément les cobayes qui meurent d'infection typhique, après avoir été préparés à l'accoutumance intestinale du poison avec les produits de la fermentation putride.

Chez ces animaux on ne constate aucune réaction intestinale; les masses intestinales apparaissent anémiques, sèches, peut-être encore plus pâles qu'à l'état normal; mais d'autres muqueuses, telles que celles de l'utérus et de la trachée, se présentent avec les caractères congestifs plus ou moins graves que nous avons signalés dans l'intoxication typhique des cobayes neufs.

Tout cela fait croire que l'accoutumance des cellules aux poisons microbiens s'obtient de préférence dans les parois intestinales parce que c'est à travers celles-ci, ou sur elles, que ces poisons s'éliminent ou exercent une action vraiment active. Ce fait trouve encore une confirmation dans les données fournies par les cobayes qui, après avoir été précédemment vaccinés, ont perdu ensuite, avec le temps, l'immunité, et peuvent succomber à la suite des inoculations du virus typhique.

Il est impossible d'établir des limites à la durée de l'immunité vaccinale contre l'infection typhique; quelle que soit la méthode employée pour l'obtenir, elle peut être plus ou moins grande, suivant la force du virus avec lequel on en essaie la résistance, et suivant la réceptivité individuelle.

Néanmoins, il est à supposer qu'elle ne se maintient pas très longtemps; environ deux mois après, elle commence à disparaître, et les animaux déjà solidement vaccinés et éprouvés contre un virus actif finissent par succomber régulièrement aux doses ordinaires des cultures typhiques.

Toutefois, le résultat de l'examen abdominal à l'autopsie de

ces cobayes n'est jamais celui de la fièvre typhoïde expérimentale typique. La réaction intestinale fait entièrement défaut; il n'y a ni congestions, ni hémorragies, ni traces d'entérite toxique; l'intestin est normal comme celui des cobayes soumis à l'accoutumance locale, soit avec les produits de la fermentation putride, soit avec l'ingestion du poison typhique (voir appendice n° 3).

Ces faits démontrent que : *les cultures stérilisées du bacille d'Eberth, injectées peu à peu dans l'organisme, produisent, outre la vaccination générale, l'accoutumance intestinale au poison typhique.*

Et, puisque cette dernière peut se conserver encore après que la première a été perdue, on doit supposer que *ce sont précisément les cellules intestinales qui ressentent avec le plus d'efficacité et, par conséquent, d'une manière plus stable, les effets de la toxine typhique.*

Tout cela n'est d'ailleurs qu'une confirmation plus complète de ce que nous avons dit jusqu'à présent touchant l'action élective de ce poison sur l'intestin de l'homme et des animaux sensibles.

∴

Nous avons vu plus haut que le poison typhique, injecté directement dans l'intestin, ou bien n'est presque pas absorbé dans l'organisme, ou bien est absorbé, modifié et privé de son pouvoir toxique.

Pour essayer de voir les causes de cette innocuité, j'ai injecté à quelques petits cobayes les toxines si actives qui m'ont déjà servi dans d'autres recherches, et qui peuvent tuer les plus gros cobayes à la dose sous-cutanée de 1,5 c. c. par chaque 100 grammes de poids.

Chez trois cobayes, du poids de 180, 210 et 255 grammes, avec une injection gastrique de 4, 8, 15 c. c. d'un liquide si actif, je ne parvins à observer aucun signe de maladie, pas même une déviation sensible de la courbe thermique journalière normale.

L'insensibilité des parois intestinales envers une substance qui manifeste une action si énergiquement élective sur elles lorsqu'elle y arrive par la voie de la circulation générale, est

certainement un fait remarquable, qui n'a point d'analogue en microbiologie, si l'on en excepte celui qui a été observé par Charrin[1] à propos du poison du bacille pyocyanique.

Ce savant a démontré que l'injection de 60-80 c. c. d'une culture stérilisée du B. pyocyanique dans les veines de l'oreille d'un lapin, amène une forte diarrhée intestinale au bout de vingt-quatre et quarante-huit heures; si, au contraire, on fait ingérer à l'animal la même culture stérilisée, la diarrhée n'apparaît nullement. Suivant Charrin, la porte d'entrée du poison posséderait, à cet égard, une influence comparable à celle qu'on observe pour le microbe vivant; en effet, on sait que le B. pyocyanique n'est pas pathogène lorsqu'il pénètre par la voie intestinale, tandis qu'il produit la mort quand il envahit l'organisme par la voie de la circulation générale.

Si nous voulions pousser plus loin encore les analogies biologiques, déjà si étroites d'autre part, entre la maladie pyocyanique et l'infection typhique expérimentale, nous devrions arriver à la même conclusion en ce qui concerne la fièvre typhoïde humaine, c'est-à-dire que le virus de la fièvre typhoïde exercerait son action pathogène ailleurs que dans l'intestin; *la fièvre typhoïde ne serait donc pas une infection intestinale.*

Cette théorie qui, à première vue, semble heurter toutes les idées régnantes sur l'étiologie de la fièvre typhoïde humaine, concorde parfaitement d'autre part avec ce qui est ressorti continuellement de nos recherches.

*
* *

Nous avons déjà eu l'occasion de constater que, pendant la vaccination contre la fièvre typhoïde, les microbes tendent à disparaître du contenu intestinal, tandis que, chez les cobayes qui succombent à l'infection ou à l'intoxication typhique, ils subissent une excessive multiplication et deviennent virulents. Nous avons, en outre, cherché à expliquer ces deux faits, et nous avons trouvé que, dans le premier cas, la destruction des microbes est très probablement l'œuvre des cellules intestinales, tandis que, dans le second cas, entrerait en jeu l'action directe de la toxine typhique.

1. *La maladie pyocyanique*, Paris, Steinheil, 1889, p. 67.

Il reste donc à étudier maintenant comment se comportent les microbes intestinaux chez les cobayes dont l'intestin est accoutumé au poison typhique, et chez ceux qui meurent de fièvre typhoïde expérimentale sans aucune réaction de la part du canal digestif. Pour savoir comment se comportent les microbes dans l'accoutumance intestinale, j'ai tué deux cobayes accoutumés, et j'ai étudié, par le procédé décrit dans mon précédent mémoire, le contenu de l'intestin grêle, lequel, comme on le sait, est non seulement le point d'élection préféré du poison typhique, mais encore la portion du canal digestif la plus favorable à des études de cette nature.

Les plaques de gélatine lactosée au tournesol, même faites avec des dilutions concentrées de matière intestinale, restèrent, dans les deux cas, complètement stériles, et les cultures en trait sur gélose, ensemencées avec des anses de platine chargées de matière intestinale, ne donnèrent que de rares colonies *coliformes* à développement très lent.

Les inoculations de ces microbes *coliformes*, sous la peau des cobayes, restèrent invariablement sans résultat.

Il ressort de là que, dans l'accoutumance intestinale également, on observe les mêmes phénomènes que dans la vaccination de l'organisme contre l'infection typhique, c'est-à-dire que les microbes intestinaux, représentés presque exclusivement par les espèces *coliformes*, tendent à disparaître de l'intestin grêle.

Au contraire, lorsque les cobayes, même doués d'une solide accoutumance intestinale, meurent d'une infection typhique généralisée, on retrouve les microbes *coliformes* extraordinairement augmentés en nombre et très virulents.

Si l'on considère ensuite que, dans ce cas, les microbes se multiplient et deviennent virulents, bien que l'intestin reste indemne de la moindre lésion typhique, on conclura que les modifications biologiques des espèces intestinales doivent être attribuées plutôt à l'action directe de la toxine typhique qu'à des altérations anatomiques particulières des parois intestinales.

Il n'est pas sans intérêt de remarquer la coïncidence de ces trois faits qui, tout d'abord, sembleraient inconciliables entre eux : présence de la toxine typhique dans l'organisme, virulence des microbes intestinaux, et absence de la diarrhée et des lésions concomitantes de la muqueuse digestive.

Il y a évidemment là une autre confirmation de ce que nous avons rappelé en commençant, c'est-à-dire de l'existence chez l'homme de fièvres typhoïdes que n'accompagne aucune lésion anatomique ou symptomatologique de l'appareil digestif.

IV

L'IMMUNITÉ CONTRE LA FIÈVRE TYPHOIDE. — LE PRÉTENDU POUVOIR BACTÉRICIDE ET ANTITOXIQUE DU SÉRUM. — L'ACTION DES PHAGOCYTES

La fièvre typhoïde ressemble si peu aux maladies que l'on a récemment étudiées au point de vue de l'immunité, que cette étude s'imposait aussi pour elle.

Sur l'immunité contre la fièvre typhoïde expérimentale, nous possédons déjà quelques recherches de Bitter [1], de Stern [2] et de Bruschettini [3], qui se sont bornés à l'examen d'une théorie autrefois en faveur, mais aujourd'hui bien ébranlée, la théorie humorale. Comme causes exclusives de l'immunité contre la fièvre typhoïde, ils ont invoqué soit le *pouvoir bactéricide*, soit le *pouvoir antitoxique* du sérum.

Relativement au *pouvoir bactéricide* du sérum, Stern a comparé les sérums de cinq convalescents de fièvre typhoïde avec des sérums d'autres malades qui n'avaient jamais eu cette affection, et il a vu que non seulement les premiers n'étaient doués d'aucun pouvoir bactéricide, mais que cette propriété apparaissait beaucoup plus évidente dans les derniers.

Néanmoins, Bruschettini est parvenu à la mettre en évidence, dans quelques recherches exécutées avec du sérum de lapins normaux et avec du sérum de lapins vaccinés. Contrairement à ce que Stern a obtenu chez l'homme, Bruschettini trouve au sérum de lapins immunisés une action bactéricide beaucoup plus forte que celle du sérum normal; elle serait capable de détruire, en douze heures, tous les microbes ensemencés.

Ces savants, en désaccord au sujet des propriétés microbicides, s'accordent au contraire à reconnaître au sérum des

1. Ueber Festigung von Versuchsthieren gegen die toxine der Typhusbacillen (*Zeitschr. f. Hygiène*, 1892, p. 298).
2. Ueber Immunität gegen Abdominaltyphus (*Deutsche Med. Wochenschrift*, 1892, n° 37).
3. Sulla Immunitá contro il tifo (*Riforma Medica*, 1892, n° 181).

animaux vaccinés contre le bacille typhique des propriétés antitoxiques comparables à celles du sang des animaux vaccinés contre le tétanos et la diphtérie.

Bitter, Stern et Bruschettini ont employé, pour démontrer cette action antitoxique du sérum, des méthodes différentes, sur lesquelles nous insisterons un peu, à raison de la nature même de nos recherches.

Bitter évapore au 1/10, dans le vide, des cultures typhiques en bouillon glycériné à 5 0/0, et obtient ainsi un liquide qui tue, sans exception, les lapins de 1,200-1,700 grammes, à la dose de 0,5 à 0,7 c. c. Il injecte ce liquide dans les veines de 20 lapins à doses croissantes, à partir de 0,1 c. c. jusqu'à 1 c. c.

Durant ce traitement, 15 lapins succombent, et comme les 5 autres sont survécu à l'injection d'une dose de toxine mortelle pour les lapins neufs, Bitter déclare avec raison qu'ils ont acquis une certaine résistance au poison typhique.

Attribuant cette résistance à une propriété antitoxique acquise par le sérum, il mêle 10 c. c. de ses toxines avec 10 c. c. de sérum retiré de ces lapins, et il inocule 2 c. c. de ce mélange à un lapin qui survit, tandis que succombe le lapin de contrôle inoculé avec la seule dose de toxine. De là, il conclut à l'existence d'une antitoxine capable de détruire le poison typhique.

Toutefois, cette conclusion ne s'impose pas ; car cette résistance de 5 lapins sur 20, après quarante-quatre jours d'injections lentement croissantes, à une dose de poison très peu supérieure à la dose mortelle, semble provenir bien plus d'une simple accoutumance à la toxine que de l'existence d'une propriété antitoxique du sérum.

Metchnikoff et Roudenko [1] ont produit chez leurs cobayes une accoutumance encore plus marquée vis-à-vis des toxines vibrioniennes, et cependant leurs cobayes vaccinés contre le vibrion avicide ne possédaient pas un sérum antitoxique.

Quelle différence entre ces animaux possédant l'accoutumance et les animaux vaccinés par Behring et Kitasato contre le tétanos, animaux qui supportent facilement des doses vingt fois plus grandes que celles qui tuent les animaux neufs.

Relativement à l'inoculation d'épreuve, on peut se demander

1. *Loc. cit.*

enfin si une seule expérience suffit, surtout avec des animaux d'une sensibilité si inconstante envers la toxine typhique, et avec une dose toxique de si peu supérieure à la dose mortelle [1].

Les recherches de Stern semblent plus démonstratives. Il emploie du sérum de convalescents de fièvre typhoïde, le mélange avec des doses toxiques de cultures typhiques stérilisées, et démontre l'innocuité de ces mélanges chez les souris blanches.

La souris réagit d'une manière très inconstante envers le poison typhique, et Stern aurait mieux fait de s'adresser à des animaux un peu plus adaptés pour des expériences de cette nature. De plus, un passage d'une de ses publications récentes [2] soulève quelques doutes sur l'existence de cette propriété antitoxique dans le sérum des convalescents de fièvre typhoïde.

Stern, en effet, s'exprime ainsi : « Si nous mélangeons une culture virulente de B. typhique et de sérum immunisant, par exemple dans la proportion de 1 : 10, nous pouvons *tout d'abord* injecter à nos animaux une quantité même supérieure à la dose *mortelle*, sans qu'il apparaisse de symptômes de maladie. Si, au contraire, nous laissons pendant quelques jours le mélange dans l'étuve, *les bacilles se multiplient* et il suffit de la dixième partie de la dose, *qui d'abord ne pouvait produire la maladie*, pour tuer les animaux. »

Il est clair que, dans le premier cas, le mélange devait, en effet, être inoffensif; car, avec la dose mortelle du *virus*, était inoculée une certaine quantité de sérum immunisant, lequel, comme on le sait, est doué d'énergiques propriétés *thérapeutiques*. Il ne s'agit donc nullement encore d'un phénomène antitoxique.

Dans le second cas, au contraire, le mélange étant resté pendant quelques jours dans l'étuve, il s'était produit, évidemment, une certaine quantité de poison, d'autant plus que le sérum de sang constitue un milieu plus favorable au développement et à la toxicité des cultures que les liquides nutritifs ordinaires. Par conséquent, comme Stern, dans ses observations, employait toujours les souris, lesquelles, le plus souvent, sont extrêmement

1. Brieger, Kitasato et Wassermann, eux aussi, déclarent explicitement que « les lapins sont très résistants à l'intoxication typhique et par conséquent tout à fait inadaptés pour de semblables recherches ». (*Zeitschr. für Hygiène*, 1892, p. 135.)

2. Ueber einige Beziehungen zwischen menschlichen Blutserum und pathogenen Bakterien (*Verhandl. des Zwolften Congress für innere Medicin*, avril 1893, p. 286).

sensibles à l'injection *intrapéritonéale* de toxine typhique, il n'y a pas à s'étonner si tous les animaux succombaient, même aux petites doses du mélange devenu réellement toxique.

C'est pourquoi il est difficile d'admettre, dans ce sérum, la présence du moindre pouvoir antitoxique, car il ne se serait ni affaibli ni détruit, soit par la multiplication des microbes, soit par la faible température de l'étuve. Toutes les souris de Stern auraient dû, dans ce cas aussi, rester vivantes.

Les expériences de Bruschettini partent d'un principe que nous ne pouvons, aujourd'hui, regarder comme exact, à savoir que, si on supprime la *toxicité* des cultures typhiques, elles sont inoffensives. Par conséquent, il ne se préoccupe jamais d'éliminer les microbes des cultures, et il mêle directement 1 c. c. de celles-ci avec 2 c. c. de sérum obtenu d'un lapin qu'il regarde comme immunisé.

Après cela, il place le mélange dans l'étuve à 37°. Au bout de six heures, il inocule un premier lapin, lequel meurt après trois jours, comme le lapin de contrôle, inoculé avec des cultures pures; au bout de douze heures, il inocule un deuxième lapin, qui meurt également sept jours après le lapin de contrôle; enfin, au bout de vingt-quatre heures, il inocule un troisième lapin qui survit, tandis que le lapin de contrôle meurt deux jours après. De ces seuls résultats, Bruschettini conclut, que le poison typhique a ressenti une *action très marquée* par l'effet du sérum.

Il est clair, cependant, que ces résultats n'ont rien d'analogue avec ce qu'on observe d'ordinaire quand on a affaire à un véritable pouvoir antitoxique. L'auteur ne nous dit pas si les animaux moururent d'infection ou d'intoxication; mais la petite dose employée (1 c. c. de culture) exclut ce dernier cas. D'autre part, aujourd'hui on ne peut admettre que les bacilles d'Eberth ne soient pas en état de se multiplier dans l'organisme; au contraire, ils peuvent parfois déterminer, chez les lapins, de véritables infections de forme septicémique [1].

Outre cela, Bruschettini n'a pas pensé que le sérum vaccinal pouvait exercer, avant tout, une *action thérapeutique*.

La méconnaissance de cette action thérapeutique et l'idée que les bacilles typhiques, suivant l'ancienne théorie de Beumer et Peiper, ne devaient pas être considérés par eux-mêmes comme

1. Voir *Annales de l'Institut Pasteur*, nov. 1892, p. 739.

pathogènes, ont suggéré à l'expérimentateur une conclusion non justifiée.

Il est même étrange que, dans ses expériences, Bruschettini ait dû compter quelques insuccès, et, puisque ses animaux d'expérience, ainsi que les animaux de contrôle, ont évidemment succombé à une infection, il faut penser que le sérum mêlé aux *cultures* ne manifestait pas une action assez thérapeutique, et que, par conséquent, le lapin dont il avait pris ce sérum n'était pas encore bien vacciné contre le bacille d'Eberth.

La question du pouvoir antitoxique du sérum des animaux vaccinés contre l'infection typhique reste donc entière, et j'ai cherché à l'élucider.

Comme il est désormais superflu de chercher à établir un lien entre le pouvoir bactéricide *in vitro* et le phénomène de l'immunité, le sérum des animaux vaccinés pouvant fournir d'abondantes cultures de bacilles typhiques, j'ai préféré observer ce qu'il advient du bacille d'Eberth inoculé dans l'organisme rendu réfractaire. Son lieu d'élection, qui est en même temps le point d'inoculation le plus vulnérable, est la cavité péritonéale. C'est pourquoi, à quelques cobayes bien vaccinés, j'inoculai, dans le péritoine, 1 c. c. d'une culture en bouillon qui tuait, d'ordinaire, en 18-24 heures (voir appendice n° 4).

Naturellement ces cobayes survécurent tous; mais j'en tuai deux au bout de quarante-huit heures, deux autres au bout de trois jours, et le dernier, au bout de six jours, tirant de nouveau, de la cavité péritonéale de chacun, des cultures pures de bacilles typhiques qui, après s'être développées en bouillon, pendant 24 heures dans l'étuve, étaient successivement inoculées à la dose de 1 c. c. dans le péritoine d'autant de cobayes neufs.

Les premiers de ces cobayes (c'est-à-dire ceux qui avaient reçu les cultures obtenues du péritoine des cobayes tués au bout de quarante-huit heures) moururent d'infection typhique au bout de 16-18 heures; les seconds cobayes (qui avaient reçu les cultures obtenues du péritoine des cobayes tués au bout de trois jours), moururent également d'infection au bout de 10-12 heures; le troisième cobaye (qui avait reçu la culture tirée du péritoine du cobaye tué au bout de six jours), mourut également d'infection au bout de huit heures, présentant à l'examen abdominal le tableau le plus caractéristique qu'il m'ait été donné d'observer

durant mes nombreuses recherches sur la fièvre typhoïde expérimentale. Son intestin grêle, spécialement, portait les traces d'une action toxique si violente, qu'il y en avait des portions d'une couleur ardoisée, qui non seulement semblaient congestionnées ou hyperhémiques, mais encore absolument gangrenées.

L'hypertrophie des plaques de Peyer était si fort développée que je m'en suis servi pour faire des préparations histologiques, qui sont des meilleures de ce genre que j'aie jamais obtenues.

Ces résultats prouvent en tout cas, mieux que toute autre recherche exécutée *in vitro*, que les humeurs d'un animal vacciné contre l'infection typhique ne sont en état ni de tuer ni d'atténuer les bacilles d'Eberth. Au contraire, ils confirment la loi déjà démontrée pour d'autres microbes, et, dans ce cas spécial, constatée *in vitro* également par Stern[1], à savoir : *que dans l'organisme, des animaux vaccinés contre la fièvre typhoïde, les bacilles d'Eberth conservent longtemps leur vitalité et exaltent progressivement leur virulence.*

Pour étudier l'éventuelle action antitoxique du sérum, j'ai eu recours d'abord à quelques expériences exécutées à peu près de la même manière.

Après avoir choisi des cobayes bien vaccinés et éprouvés avec un virus très actif, je les inoculais, en même temps qu'autant de cobayes de contrôle, avec des doses mortelles d'un liquide toxique qui tuait à la dose de 1,5 c. c. par 100 grammes du poids de l'animal, et qui m'avait déjà servi dans les recherches sur la toxine typhique, exposées dans mon précédent mémoire (voir appendice n° 5).

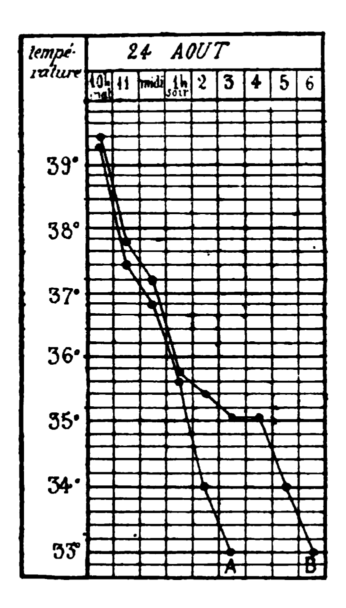
Or, dans toutes ces expériences, non seulement j'obtins la mort des animaux, — ce qui ferait supposer que, dans l'organisme des cobayes vaccinés, il n'existe aucune substance capable de neutraliser ou de détruire le poison typhique, — mais les animaux vaccinés moururent presque toujours quelques heures avant ceux de contrôle, présentant une rapide hypothermie sans pauses et sans oscillations.

Les tracés graphiques suivants, empruntés à une de ces recherches, montrent les différences de deux courbes hypother-

1. *Loc. cit.*, p. 290.

miques, qui indiquent *que les cobayes vaccinés sont beaucoup plus sensibles à la toxine typhique que les cobayes de contrôle non vaccinés.*

Dans ce cas encore se reproduit donc le phénomène découvert par Charrin et Gamaléia [1], d'après lesquels les animaux



Courbe hypothermique d'un cobaye vacciné et inoculé avec la toxine typhique.

A. Cobaye *vacciné* (265 gr.). Injection sous-cutanée de 4 c. c. de toxine (1,5 0/0 du poids du corps)
B. Cobaye *de contrôle* (270 gr.). injection *idem.*

vaccinés contre la maladie pyocyanique seraient beaucoup plus sensibles au poison de ce microbe que les animaux non vaccinés.

Ce phénomène, comme on le sait, fut ensuite confirmé également par Metchnikoff [2], chez les lapins vaccinés contre le Hog-Choléra, par moi [3], chez les cobayes vaccinés contre le *vibrion aviaire*, et par Issaeff [4], chez les lapins vaccinés contre le pneumocoque.

Toutefois, dans l'empoisonnement typhique des cobayes

1. Vaccination et résistance aux poisons microbiens (*Comptes rendus de la Société de biologie*, 1890, n° 19, p. 294).

2. Immunité des lapins vaccinés contre le microbe du Hog-Choléra (*Annales de l'Inst. Pasteur*, 1892, p. 306).

3. Les moyens de défense de l'organisme contre les microbes (*Ibidem*, 1893, p. 238).

4. Contribution à l'étude de l'immunité acquise contre le pneumocoque (*Ibidem*, 1893, p. 260).

vaccinés, on observait, en outre, quelques autres caractères que je crois opportun de signaler.

Tandis que les cobayes neufs présentent, comme on le sait, le tableau symptomatologique habituel, rapide météorisme, grande sensibilité abdominale, congestion intense de tous les viscères et surtout de l'intestin, entérite aiguë hémorragique, hypertrophie des plaques de Peyer, etc., chez les cobayes vaccinés, au contraire, ces phénomènes sont très atténués ou font tout à fait défaut, et cela confirme l'idée que j'ai exprimée plus haut, au sujet de l'accoutumance intestinale à la toxine typhique.

Par conséquent, non seulement les cobayes traités par voie intestinale, mais encore les cobayes vaccinés contre le même virus, possèdent l'accoutumance intestinale au poison typhique. Cela démontre que le phénomène de l'accoutumance peut, parfois, se produire seulement dans une certaine catégorie de cellules.

Dans le cas actuel, de ce que les cobayes succombèrent malgré l'absence de réaction intestinale, on doit conclure que si l'accoutumance à la toxine typhique peut être obtenue dans l'intestin, elle n'est peut-être pas possible pour le système nerveux.

Ceci concorde avec ce qu'on observe exceptionnellement chez l'homme et ce qu'on obtient expérimentalement chez les animaux, c'est-à-dire : *la fièvre typhoïde sans lésions intestinales.*

*
* *

Mais, si l'organisme des animaux vaccinés n'est pas en état de neutraliser ou de détruire la toxine typhique, cet important phénomène pourrait-il, au contraire, se produire *in vitro*, comme dans les cas observés par Bitter et par Stern?

Le moyen de s'en assurer était de mélanger directement la toxine typhique au sérum de cobayes vaccinés, et d'inoculer le mélange à des cobayes neufs. La toxine employée tuait, comme je l'ai dit plus haut, à la dose de 1,5 c. c. par 100 grammes du poids de l'animal; le sérum était obtenu en saignant des cobayes très robustes et bien vaccinés.

J'ai fait ainsi cinq expériences sur les cobayes et douze sur les souris, et jamais le sérum des cobayes vaccinés ne mani-

festa le moindre pouvoir antitoxique. Tous les animaux, inoculés avec les mélanges les plus variés de sérum et de toxine, moururent, à l'exception de deux souris, avec les mêmes phénomènes et à peu près dans la même période de temps que les animaux de contrôle (voir appendice n° 6).

Cependant, quelques particularités observées chez les souris méritent de fixer notre attention, car elles présentent d'étroits rapports avec les expériences de Stern, desquelles ressortirait la propriété antitoxique du sérum.

J'ai déjà insisté ailleurs sur la sensibilité très variable des souris pour le poison typhique.

On sait que pour tuer une souris il suffit de 0,2 c. c. et parfois de 0,1 c. c. de toxine, en injection intrapéritonéale, tandis que souvent l'injection sous-cutanée de 0, 8 à 1 c. c. n'est pas suffisante.

De plus, les souris inoculées dans le péritoine, même avec des quantités très petites de toxine, meurent avec une extrême rapidité, parfois en quelques heures, tandis que celles qui sont inoculées à fortes doses sous la peau ne meurent pas avant 18-24 heures; c'est-à-dire que les souris, qui ont reçu presque 5 c. c. de toxine pour 100 grammes de leur poids (le poids d'une souris est, le plus souvent, de 18-20 grammes), meurent plus tard que les cobayes, lesquels ne reçoivent pas plus de 1,5 c. c. par chaque 100 grammes du poids du corps. Les souris sont donc beaucoup plus résistantes que les cobayes au poison typhique.

Le même phénomène se produit quand on emploie les cultures vivantes. On observe, en effet, que deux gouttes seulement d'une culture injectée dans le péritoine tuent rapidement, tandis qu'il faut au moins 0, 5 c. c. si l'injection est pratiquée sous la peau.

Outre cela, on trouve que, dans le premier cas, la mort est due à une péritonite très aiguë, presque sans diffusion des microbes dans l'organisme, tandis que, dans le second, a lieu une véritable infection générale.

J'ai mentionné ailleurs [1] des observations de cette nature, concluant que l'injection intrapéritonéale chez les souris produit la mort plutôt par l'effet de la péritonite que par l'infection microbienne.

Le péritoine des souris présente donc, vis-à-vis du poison

1. Voir *Annales de l'Institut Pasteur*, 1892, p. 738.

typhique, une sensibilité locale exceptionnellement marquée; c'est pourquoi, même sans qu'il soit besoin d'atteindre le rapport nécessaire entre la dose toxique et la sensibilité générale, les animaux peuvent succomber par la seule violence de la réaction locale.

Les choses étant ainsi établies, on comprend sans difficulté que, chez les souris, l'injection, dans le péritoine, d'une quantité de poison capable de produire la mort, puisse ne pas représenter effectivement la dose toxique, et que, par conséquent, ses effets puissent changer dans tous les cas où les conséquences de la réaction locale restent simplement mitigées.

Un de ces cas, par exemple, serait la dilution dans le sérum de sang. C'est peut-être là une des raisons pour lesquelles, dans les expériences de Stern, les souris qui recevaient l'injection intrapéritonéale de toxine mêlée avec du sérum, survivaient, tandis que les souris inoculées avec des toxines seules mouraient régulièrement.

Toutefois, dans mes expériences, ces effets probables de la dilution n'apparurent pas très manifestes.

Tous les animaux (à l'exception de deux souris), inoculés sous la peau ou dans le péritoine, avec des doses mortelles de toxines seules ou mêlées à du sérum, moururent régulièrement, et me donnèrent la conviction que : *le sérum des animaux vaccinés contre l'infection typhique n'est doué d'aucun pouvoir antitoxique contre le poison produit par le bacille d'Eberth.*

Restait toutefois à définir un autre problème susceptible d'être soulevé après les résultats de Bitter.

Le sérum employé par Bitter, dans sa dernière expérience, sur laquelle il appuie l'idée principale du pouvoir antitoxique, provenait d'un lapin qui, non seulement devait être vacciné, mais encore était habitué à tolérer une dose de poison supérieure à la dose strictement mortelle; en d'autres termes, le sérum de Bitter appartenait à des lapins *hypervaccinés.*

Le hasard m'a fourni l'occasion de pouvoir observer aussi ce côté de la question.

Le sérum de lapin hypervacciné me fut fourni par un animal qui vivait depuis longtemps dans le laboratoire, et qui avait subi, à plusieurs reprises, l'injection de très fortes doses de toxines typhiques.

Ce lapin avait été vacciné l'année précédente avec 30 c. c. de cultures stérilisées, et m'avait déjà fourni un bon sérum thérapeutique, bien que, par l'effet de la vaccination et des successives inoculations d'essai, son poids fût tombé, en quelques jours, de 2,500 à 1,800 grammes.

Comme il survécut à la saignée, je trouvai, environ huit mois après, que ce même lapin avait excessivement augmenté : il pesait 4,600 grammes. Le 5 juillet, je commençai de nouveau à l'inoculer presque quotidiennement, avec 6-8-12 c. c. de cultures stérilisées ; c'est pourquoi, le 18 août, il en avait reçu au total, sous la peau, 154 c. c., quantité capable de tuer immanquablement, même à doses très fractionnées, quatre lapins de 2,000 grammes chacun.

Malgré cela, l'animal s'était maintenu en excellentes conditions ; il avait perdu seulement 80 grammes de poids ; il fut ensuite inoculé dans les veines avec 1 c.c. de culture virulente.

Dix jours après, je pratiquai la saignée et j'obtins une abondante quantité de sérum qui servit à mes expériences. Elles furent au nombre de trois, et je les pratiquai sur les cobayes voir appendice n° 7).

La quantité de toxine inoculée sous la peau fut toujours la dose mortelle *minima*, c'est-à-dire 1,5 c. c. 0/0 du poids ; la quantité de sérum mélangé fut, dans le premier et le second cas, du double, dans le troisième cas, du triple de la toxine.

Dans tous les cas, cependant, j'obtins régulièrement la mort des animaux, à peu près dans la même période de temps et avec les mêmes symptômes que ceux qui se produisirent chez les animaux de contrôle.

* * *

Bien que, dans la fièvre typhoïde humaine et expérimentale, les effets du poison élaboré par le bacille d'Eberth représentent le caractère prédominant de la maladie, cependant, il paraît naturel de conclure de ce que les animaux vaccinés ne sont pas immunisés contre l'intoxication, que *la fièvre typhoïde est une infection et non une intoxication*. C'est ce qui était déjà arrivé pour le choléra expérimental, à propos duquel a existé aussi, pendant longtemps, une divergence de concepts théoriques, qui a disparu

à la suite des travaux récents de Pfeiffer, de Wassermann [1] et Metchnikoff [2].

Et, puisque les théories humorales se sont montrées impuissantes à nous donner l'explication de l'immunité, il est naturel de rechercher les moyens de défense de l'organisme vacciné dans les éléments cellulaires mêmes. Cette étude de la réaction cellulaire, chez les animaux vaccinés contre la fièvre typhoïde expérimentale, est heureusement très facile.

Les bacilles d'Eberth trouvant, comme on le sait, dans la cavité péritonéale, un milieu très favorable à leur multiplication, c'est là qu'on doit étudier les réactions réciproques des cellules et des microbes.

Lorsqu'on inocule, dans le péritoine des cobayes, une culture virulente de bacilles typhiques, les animaux succombent en quelques heures, et présentent, dans la cavité péritonéale, un exsudat plus ou moins abondant où, parmi les microbes extraordinairement multipliés, ne se rencontrent que de très rares leucocytes. Il n'y a pas la moindre trace de réaction cellulaire.

Si, au contraire, on inocule la culture virulente dans le péritoine des cobayes bien vaccinés, ceux-ci pourront présenter, tout au plus, une hyperthermie transitoire, mais ils survivent, sans exception. En les tuant soit quelques heures après l'inoculation du virus, soit lorsqu'ils ont sûrement échappé à tout danger d'infection, c'est-à-dire au bout de trente-six à quarante-huit heures, ils ne présentent jamais d'exsudats ; la cavité péritonéale est absolument vide. Une mince couche luisante et visqueuse revêt, cependant, la surface des viscères abdominaux, comme s'ils étaient recouverts d'une patine blanchâtre.

Si l'on examine au microscope une petite portion de cet exsudat, on trouve qu'il est presque exclusivement formé de leucocytes et de microbes endocellulaires.

Bargellini a fait une série complète de recherches sur cette question, et je renvoie à celles-ci le lecteur désireux de plus amples détails.

En suivant la méthode que j'ai déjà indiquée dans l'étude de

1. Untersuchungen über das Wesen der Choleraimmunität. (*Zeitschrift fur Hygiene*, 1893, p. 46).

2. Recherches sur le choléra et les vibrions (*Annales de l'Institut Pasteur*, 1893, p. 403 et 562).

l'immunité contre le *vibrion aviaire*, Bargellini [1] inoculait le virus typhique à des séries de trois cobayes ; le premier cobaye était vacciné, le second était traité par un sérum préventif, et le troisième restait comme contrôle.

Après cela, il comptait les leucocytes du sang chaque deux heures et, dès que le cobaye de contrôle était mort, il tuait les deux autres, pratiquant l'examen et la numération des leucocytes dans l'exsudat péritonéal.

Je rapporterai seulement les chiffres d'une des nombreuses expériences de Bargellini. Ils indiquent le nombre des leucocytes retrouvés dans les exsudats péritonéaux des cobayes susdits :

	NOMBRE DES LEUCOCYTES POUR 1 c. c.		
	MONONUCLÉÉS	POLYNUCLÉÉS	TOTAL
1er cobaye : vacciné	4,336	92,020	97,156
2e cobaye : traité par du sérum.	6,100	78,400	84,240
3e cobaye : contrôle	3,600	1,422	5,022

Ces chiffres sont par eux-mêmes assez éloquents. Non seulement ils nous fournissent la mesure de la prodigieuse réaction phagocytaire qui a lieu dans l'organisme vacciné, mais ils nous démontrent encore la valeur de l'intervention cellulaire dans la protection de l'organisme contre les microbes. Peu d'autres maladies expérimentales mettent aussi nettement le fait en évidence, et on trouverait difficilement un exemple plus démonstratif à l'appui de la théorie cellulaire de l'immunité.

Je crois inutile de m'arrêter à démontrer que les bacilles typhiques englobés par les phagocytes sont toujours virulents, puisque j'ai mentionné plus haut que, même au bout de six jours, il est possible de tirer, de l'exsudat d'un cobaye vacciné, un virus exceptionnellement actif sans qu'on trouve alors de bacilles libres dans le péritoine ; on sait du reste que les microbes conservent ou même exaltent leur virulence en passant par les animaux réfractaires.

1. Contributo allo studio della immunità vaccinale (*Rivista d'Igiène e Sanità Pubblica*, mai 1894).

V

B. TYPHIQUE ET *B. coli*.

La question concernant les rapports spécifiques entre ces deux microbes se trouve depuis quelques années à l'ordre du jour en bactériologie. Posée par l'école de Lyon, elle a fait l'objet d'une quantité énorme de recherches, que nous nous abstiendrons de résumer, mais qui disent assez l'intérêt et la difficulté d'un jugement définitif.

Dans les intéressants mémoires de MM. Macaigne [1], Wurtz [2], Malvoz [3], Terni [4], Cesaris-Demel et Orlandi [5], on trouvera, résumés avec une grande exactitude, tous les caractères différentiels ou communs des deux microbes. Mais, à mon avis, il s'agit moins d'en multiplier à l'infini les ressemblances ou les différences superficielles, au moyen d'artifices de technique, que de démontrer pourquoi le *B. coli* virulent, et par conséquent pathogène, provoque chez l'homme, dans un cas, une maladie du type choléra (*choléra nostras*), et dans l'autre une maladie du type fièvre typhoïde, tandis que sa nature, et par conséquent les effets de ses toxines devraient être identiques. En d'autres termes, il convient de démontrer l'identité ou la différence entre les toxines du *B. coli* et du B. typhique.

Le simple cours de la température, chez l'animal empoisonné ou inoculé avec le virus, ne saurait être une base suffisante pour établir, comme l'ont fait Rodet et G. Roux [6], l'identité de ces deux toxines.

Lorsqu'on inocule un animal avec une toxine microbienne, à dose rapidement toxique, ou qu'on l'infecte avec un virus rapidement mortel, la courbe de la température est presque toujours la même. Il y a une légère élévation immédiatement après l'in-

1. Le bacterium coli commune, son rôle dans la pathologie. Paris, 1892.
2. Le bacterium coli commun (*Arch. de Méd. expérimentale*, 1893, n° 1).
3. Recherches bactériologiques sur la fièvre typhoïde (*Mem. de l'Acad. de Méd. de Belgique*. T. IX. fasc. V,).
4. La diagnosi differenziale del bacillo del tifo (*Ann. dell'Ist. d'Igiène sper. di Roma*, Vol. III, fasc. 3).
5. Suila equivalenza biologica dei prodotti del B. coli e del B. tiphi. (*Arch. per le Sc. med.*, 1893, n° 14).
6. Bacille d'Eberth et bacillus coli (*Archives de Méd. expérimentale*, 1892, n° 3).

fection, comme on pourrait d'ailleurs l'obtenir même avec une petite quantité de toxine, et ensuite la température descend toujours, plus ou moins rapidement suivant la dose inoculée et suivant la sensibilité des animaux. L'hyperthermie représente la réaction générale de l'organisme contre les effets du poison; l'hypothermie ou le collapsus démontrent que l'organisme est vaincu et que toute résistance est finie.

Le choléra est une maladie apyrétique parce que l'empoisonnement est rapide; la résistance est nulle, et par conséquent l'issue est fatale. La fièvre typhoïde se distingue par ses pyrexies caractéristiques, parce que l'intoxication est lente et peut être tolérée pendant quelque temps par l'organisme. Lorsque cette intoxication a atteint son *maximum* et que le corps succombe, entrent en scène, ici encore, l'hypothermie et les phénomènes de collapsus, comme dans toute autre intoxication aiguë, humaine ou expérimentale. Il est donc vain de chercher à différencier les deux microbes d'après les modifications thermogénétiques de leurs poisons respectifs.

Mais, dans la toxine typhique, nous avons appris à connaître une propriété qui, maintenant, pourrait difficilement être confondue avec celle d'autres poisons microbiens, c'est l'action élective, spécifique sur toutes les muqueuses en général, et sur la muqueuse intestinale en particulier. Nous avons étudié les phénomènes et les conséquences de ces lésions toxiques intestinales et nous avons enfin trouvé la manière d'en prémunir les animaux.

Pendant mes longues recherches sur les infections typhiques et sur les infections par le *B. coli*, j'avais pu me convaincre que l'identité des lésions anatomiques, décrites par tous les auteurs qui m'ont précédé dans l'étude de cette question, n'existe pas en réalité.

Il est difficile d'établir les limites qui séparent les unes des autres, surtout si les observations ne sont pas très nombreuses; mais, après une grande quantité d'autopsies exécutées avec soin et dans les conditions d'expérience les plus variées, on arrive à conclure que, à parité de virulence et d'action toxique, les lésions des muqueuses, dans la fièvre typhoïde expérimentale, sont beaucoup plus graves que dans l'infection par le *B. coli*. Tout d'abord, cette dernière infection, au point de vue bactério-

logique, présente en général un caractère septique qui ne se trouve pas dans l'infection produite par le bacille d'Eberth, alors même que les deux virus ont été inoculés à l'état de virulence *maxima*, et qu'ils ont déterminé la mort dans la même période de temps.

Outre cela, dans l'infection par le *B. coli*, le point d'inoculation du virus présente d'ordinaire un œdème sanguinolent, une coloration rougeâtre, sale et diffuse, qu'on n'observe presque jamais dans l'infection par le B. typhique.

Le tableau toxique abdominal, au premier aspect, semble peu dissemblable si le virus a été inoculé dans le péritoine. Dans ce cas, les deux microbes déterminent toujours une péritonite plus ou moins grave, qui ressemble, à première vue, aux péritonites ordinaires. Mais, si on inocule le virus sous la peau, les effets changent notablement.

Dans la fièvre typhoïde expérimentale des cobayes, nous avons les graves lésions déjà décrites plus haut (paralysie et dilatation des parois intestinales, entérite hémorragique, etc.); dans l'infection par le *B. coli*, au contraire, malgré une grande congestion intestinale, et un certain degré d'infiltration dans les plaques de Peyer, — ce qui peut dissimuler, à première vue, l'existence de lésions identiques à celles qui sont déterminées par le poison typhique, — on n'a jamais le tableau complet et si grave que l'on observe dans la maladie aiguë déterminée par le bacille d'Eberth.

Ces observations, confirmées à de nombreuses reprises, m'avaient, pour cette raison, fait supposer que l'action du poison du *B. coli* sur la muqueuse intestinale, bien que s'exerçant dans une certaine mesure, comme celle de quelques autres poisons microbiens (poisons du vibrion aviaire, du b. pyocyanique, etc.), ne manifestait cependant pas la violence si étroitement liée au processus biologique de la toxine typhique.

La démonstration de ce fait, par voie directe, présentait toutes les difficultés auxquelles on se heurte chaque fois qu'on doit établir des comparaisons qui ne sont pas toujours constantes ou sur lesquelles domine assez souvent le critérium personnel.

C'est pourquoi je recourus à une méthode indirecte.

J'ai dit plus haut comment on peut accoutumer l'intestin des

cobayes à tolérer impunément la toxine typhique, en injectant pendant quelques jours, dans l'estomac de ces animaux, une certaine quantité de cultures typhiques stérilisées. On pouvait dès lors se demander s'il serait possible d'obtenir les mêmes résultats en injectant, dans l'estomac des cobayes, les cultures stérilisées du *B. coli*.

Cette question prend, d'autre part, un singulier intérêt; car, bien que le *B. coli* soit l'hôte habituel de l'intestin et y produise continuellement son poison et, peut-être, en quantités notables, les parois intestinales des cobayes neufs ne sont nullement accoutumées à l'action de la toxine typhique.

En présence de ce fait, on peut penser à une des hypothèses suivantes : ou bien le phénomène de l'accoutumance intestinale au poison typhique ne peut être obtenu que par voie expérimentale, ou bien, dans ce phénomène caractéristique, l'équivalence biologique des deux poisons ne s'observe pas.

Pour décider la question, j'ai eu recours au même procédé que j'ai déjà employé et décrit plus haut, pour obtenir l'accoutumance intestinale.

Après avoir ensemencé du bouillon glycériné avec un *B. coli* très virulent, j'ai abandonné les cultures pendant un mois dans l'étuve à 37°, et ensuite je les ai stérilisées à 120°.

Je choisis, ensuite, deux séries de cobayes auxquels j'injectai, par la voie de l'estomac pour la première série, et sous la peau pour la seconde, 4 c. c. du liquide susdit pendant cinq jours de suite. Au terme de cette période, quelques cobayes inoculés sous la peau moururent d'intoxication, en proie à un excessif amaigrissement; les autres, du même groupe, furent, peu après, inoculés dans le péritoine avec une dose mortelle de *B. coli* virulent, et ils survécurent.

Ils étaient donc bien vaccinés et, par conséquent, l'accoutumance intestinale chez les cobayes injectés par voie gastrique aurait dû également s'être déjà établie.

Or, les expériences démontrèrent précisément le contraire.

Tous ces cobayes, inoculés, même à petites doses, avec des cultures virulentes de bacilles typhiques, moururent, présentant le tableau abdominal classique de la fièvre typhoïde expérimentale (voir appendice n° 8).

Ce fait, en même temps qu'il démontre que le poison typhique

et le poison du *B. coli* ne possèdent pas la même fonction biologique, constitue donc, par ailleurs, entre les deux microbes, un caractère différentiel de grande valeur.

D'autre part, ce résultat est en parfaite harmonie avec ce qui doit se produire dans la nature, parce que, si le poison du *B. coli* était en état d'exercer, sur les parois intestinales et sur leur surface, les mêmes effets que nous avons reconnus au poison typhique, il resterait difficile de comprendre les lésions toxiques que l'on observe dans la muqueuse digestive dans la fièvre typhoïde humaine et expérimentale.

* * *

Après avoir démontré que la toxine du B. typhique, malgré l'apparente infériorité biologique de ce microbe, exerce sur les muqueuses une action beaucoup plus énergique que celle du *B. coli* et très différente de cette dernière, il est relativement facile d'en multiplier les caractères différentiels, en se basant sur les connaissances désormais acquises touchant la façon de se comporter de ces microbes et de leurs toxines dans l'organisme.

Une de ces connaissances a fait ressortir l'extrême facilité avec laquelle la toxine typhique, en vertu des lésions qu'elle détermine dans les muqueuses, provoque l'exaltation de la virulence et l'invasion successive de l'organisme, de la part du *B. coli* intestinal.

Il devenait donc intéressant de connaître aussi dans ce cas l'activité réciproque des deux toxines.

N'ayant pas encore réussi à préparer une toxine du *B. coli* aussi puissante que celle que j'étais parvenu à obtenir du B. typhique, je dus chercher une autre voie pour arriver au but que je m'étais proposé.

J'avais quelques vieilles cultures très toxiques de B. typhique et de *B. coli* en bouillon glycériné. En en inoculant chaque jour 4 c. c. sous la peau de cobayes de 300-400 grammes, ces animaux mouraient régulièrement après la cinquième inoculation, c'est-à-dire après que chacun d'eux en avait reçu un total de 20 c. c.

D'autre part, j'avais observé, à plusieurs reprises, que l'injection de *B. coli* à l'intérieur de l'utérus ne déterminait aucun accident morbide chez les cobayes. Évidemment, la muqueuse

utérine normale forme une solide barrière contre le passage du *B. coli* virulent.

On sait, au contraire, avec quelle facilité le *B. coli* qui se trouve au contact des muqueuses, à l'état de virulence, peut émigrer à l'intérieur des organes, lorsque la constitution anatomique de ces muqueuses est altérée par l'effet des toxines microbiennes en général, et des toxines typhiques en particulier.

Par conséquent, en inoculant journellement, sous la peau des animaux, la même dose des cultures susdites de B. typhique ou de *B. coli*, douées du même coefficient toxique, la généralisation du *B. coli* pathogène, déjà présent dans l'utérus, aurait dû se produire plus ou moins rapidement, et tout retard à cette émigration du *B. coli* pouvait fixer exactement le degré d'action toxique sur la muqueuse utérine.

C'est pourquoi, après avoir choisi six cobayes intacts et à peu près du même poids, j'inoculai, dans la cavité utérine de chacun d'eux, 1 c. c. d'une culture en bouillon d'un *B. coli* très virulent.

Deux de ces cobayes servirent de témoins; en conséquence, ils furent inoculés quelques jours auparavant et laissés à part. Comme il était à prévoir, ils survécurent. L'un d'eux, sacrifié au bout de six jours, ne présenta aucune lésion interne appréciable; les cultures du péritoine restèrent stériles, et, des cultures de la cavité utérine, j'obtins seulement deux colonies de *B. coli* (voir appendice n° 9).

Sur deux autres cobayes, on commença le 29 août l'injection sous-cutanée journalière de 4 c. c. de cultures stérilisées de *B. coli*. Ils moururent tous deux le 4 septembre, c'est-à-dire au bout de 5 jours à peine, et après avoir reçu, en tout, 20 c. c. de liquide toxique. L'autopsie démontra la présence du *B. coli*, en quantité restreinte, dans la seule cavité utérine.

Enfin, le dernier couple de cobayes fut soumis le même soir (29 août) à l'injection sous-cutanée de 4 c. c. de cultures stérilisées du B. typhique. Le matin suivant (environ 12 heures après) ces deux cobayes étaient morts. Leur exsudat péritonéal était extraordinairement riche en *B. coli;* les cultures du sang du cœur et des autres viscères démontrèrent en outre la présence du même microbe. Évidemment ces animaux étaient morts d'infection générale du *B. coli*, provoquée par l'injection de 4 c. c. seulement de poison typhique.

La notable différence dans l'intensité des effets locaux de ces deux poisons, après ce que nous avons dit sur leur mode de préparation et sur la parfaite équivalence de leur pouvoir toxique général, nous dispense de tout commentaire ultérieur.

Elle s'ajoute à ce que nous venons d'apprendre sur leur valeur réciproque dans la détermination de l'accoutumance intestinale à la toxine typhique, pour mettre définitivement en relief les différences biologiques entre les deux microbes.

Donc, même à parité de coefficient toxique général, les toxines du bacille d'Eberth exercent sur les muqueuses une action incomparablement plus énergique et plus grave que les toxines du bacille d'Escherich.

Ces deux microbes doivent donc être considérés comme deux variétés distinctes, ne pouvant se substituer l'une à l'autre, dans la pathologie humaine et expérimentale.

VI

LE PROCESSUS BIOLOGIQUE DE LA FIÈVRE TYPHOIDE HUMAINE EXPLIQUÉ D'APRÈS NOS DERNIÈRES CONNAISSANCES SUR LA FIÈVRE TYPHOIDE EXPÉRIMENTALE.

Les recherches que j'ai résumées dans ces trois mémoires sur la fièvre typhoïde expérimentale nous amènent à modifier notablement les notions actuelles touchant la fièvre typhoïde humaine.

La découverte du bacille d'Eberth, qui a renversé l'antique édifice étiologique de cette maladie, avait semblé tout d'abord tout expliquer d'une façon claire : le bacille typhique, se disait-on, pénètre dans le canal digestif, s'y multiplie avec rapidité, le couvre de ses lésions typiques, et y fabrique son poison qui doit infecter peu à peu l'organisme.

Des ulcérations intestinales, le microbe spécifique émigre peu à peu, souvent accompagné du *B. coli*, vers les autres organes lymphatiques internes : rate, glandes du mésentère, etc., et les complications de la fièvre typhoïde, les pharyngites, les bronchites, les processus catarrhaux de toutes les muqueuses, etc., sont des localisations du bacille d'Eberth; on l'y a recherché, parfois trouvé; presque toujours, cependant, on en a admis simplement la présence.

La fièvre apparut comme une conséquence directe des

troubles intestinaux, la diarrhée devint comme la *materia peccans* de la maladie, et la thérapie expérimenta contre elle les ressources de ses innombrables remèdes. L'épidémiologie, qui s'est prêtée aux faits à toutes les époques, s'est empressée de proclamer l'intangibilité des théories hydriques, comme elle avait soutenu l'influence des émanations putrides, de l'air du sous-sol, etc.

La fièvre typhoïde resta donc, ainsi que le choléra et la dysenterie, le type des maladies d'origine intestinale. Il ne faut pas s'étonner si, avec cette conception étiologique, le retour à la théorie *pythogénique de Murchison*, explicitement commencé par l'école de Lyon et brillamment soutenu par Malvoz, de Liège, n'a pas soulevé d'autres objections que celles qui sont basées sur quelques différences morphologiques ou biologiques entre le *B. coli* et le B. typhique.

Tout celà porte évidemment l'empreinte doctrinaire qui gêne si souvent dans la science le libre essor de la recherche expérimentale. Nous pouvons, aujourd'hui, nous faire d'autres idées sur cette question.

Tout d'abord, on doit abandonner la tradition qui considère la fièvre typhoïde comme une maladie d'origine intestinale : elle n'est autorisée ni par la clinique ni par la bactériologie.

Le plus souvent, en effet, les premiers symptômes de la fièvre typhoïde ne commencent pas du côté de l'intestin. Tandis que les malades marchent encore, ils se sentent fatigués, ont de légers vertiges, des bourdonnements d'oreille, des douleurs vagues, lancinantes, dans les membres ou dans le dos; ils ont un sommeil agité et plein de rêves, perdent l'appétit et sont pris de céphalée; la peau devient pâle et la physionomie exprime une grande lassitude, *quelques malades seulement souffrent déjà de douleurs de ventre et de diarrhée* [1], et le météorisme qui, avec la sensibilité douloureuse, devrait être le premier signe précurseur de la lésion intestinale, ne se produit pas toujours. Murchison [2] en a constaté l'absence dans 21 cas sur 100 : en général, ce symptôme ne se manifeste qu'après la première semaine. La *douleur* et la *sensibilité* abdominales sont des symptômes fréquents, mais non constants.

1. Griesinger, *Delle malattie da infezione*, Milan, 1864, p. 249.
2. Murchison, *Loc. cit.*, p. 126.

Il n'y a aucun rapport entre l'intensité de la *diarrhée* et l'extension des lésions intestinales constatées à l'autopsie.

Dans quelques cas, on observe d'abord une constipation qui ne se transforme en diarrhée qu'après l'administration d'un purgatif; parfois elle ne commence pas avant la troisième ou quatrième semaine de maladie; dans un grand nombre de cas elle est entièrement absente, et cependant, ces cas peuvent devenir mortels [1].

Lorsque la diarrhée commence, la rate est déjà grossie et la congestion bronchiale se révèle par des râles sibilants [2].

Quelques formes cliniques, appelées *spléno-typhoïdes*, sont caractérisées cliniquement par l'absence de désordres intestinaux, et anatomiquement par l'augmentation considérable du volume de la rate, et par des lésions intestinales peu développées ou même par l'absence de toute lésion [3].

Dans un cas mortel, observé par Thue [4], l'intestin ne présentait qu'une très légère tuméfaction des plaques de Peyer, sans ulcérations et sans hémorragies, bien que la rate et les reins continssent, à l'état de pureté, le bacille typique, Vincent [5] et Banti [6] parlent enfin de fièvres typhoïdes typiques *sans lésions intestinales*.

Telles sont, en résumé, les observations de la clinique et de l'anatomie pathologique. Quant à la présence des microbes spécifiques dans l'organe qui devrait être considéré comme leur siège le plus important, voici ce que nous connaissons.

Dans les fèces des typhiques, Gaffky [7], Di Vestea [8], Pfuhl [9], Eisenberg [10], Rodet et Roux [11], Redtenbacher [12], etc., ne parvinrent jamais à démontrer, par les cultures, la présence du bacille

1. Murchison, *lot. cit.*, p. 128.
2. Chantemesse, *Fièvre typhoïde* (*Traité de médecine de MM. Charcot, etc.*), t. I, p. 752.
3. Chantemesse, *Idem*, p. 774.
4. *Jahresbericht über die Fortschritte, etc.*, von Baumgarten, 1889, p. 196.
5. *Mercredi médical*, 1891, p. 46.
6. *Riforma medica*, oct. 1887.
7. *Mittheil aus d. Kais Gesundheitsamte.* Vol. II, 1884.
8. *Il Morgagni*, 1885.
9. *Centralblatt f. Bakteriologie*, nov. 1888.
10. *Bakteriolog. Diagnostik*, 1886.
11. *Province médicale*, 1889.
12. *Zeitschr. f. Klin. Medicin.*, nº 9, 1891.

d'Eberth; il fut trouvé quelquefois par Pfeiffer [1], Seitz [2], Merkel et Goldschmith [3], Viltschour [4]; Karlinski [5] ne l'isola jamais avant le second septenaire; Chantemesse [6] dit qu'on commence à le rencontrer du dixième au vingtième jour.....

Toutefois, ceux-là mêmes, qui ont déclaré avoir isolé, des fèces, le bacille typhique, se sont appuyés sur des caractères qui, aujourd'hui, ont perdu la valeur qu'on leur attribuait autrefois; plaques de gélose ou de gélatine lactosée au tournesol [7], cultures sur pommes de terre, mobilité, etc.

Le seul moyen qui nous soit resté jusqu'ici pour différencier d'une manière assez certaine le bacille typhique du *B. coli*, c'est la culture en bouillon lactosé avec carbonate de chaux, imaginée par Perdrix, en 1891, postérieurement aux recherches de tous les auteurs cités plus haut, de sorte que leurs conclusions ne peuvent plus mériter confiance: c'est là pourtant tout ce que peut nous apprendre la bactériologie sur la présence des bacilles d'Eberth dans les déjections des typhiques.

C'est peu, et cela contraste avec le résultat des examens bactériologiques dans une maladie vraiment intestinale, le *choléra*, où nous parvenons le plus souvent à trouver, dans les déjections, les microbes spécifiques presque à l'état de culture pure!

Nous arrivons à la même conclusion en passant en revue les publications les plus récentes sur la recherche du bacille typhique dans les plaques de Peyer, dans les follicules lymphatiques intestinaux, etc. Dans ces cas, le plus souvent, on ne fit pas même de cultures, ou bien on les fit avec des méthodes insuffisantes : on s'est contenté des résultats des colorations microscopiques des coupes, sans se préoccuper de ce que le *B. coli* (qui se comporte à la coloration comme le bacille typhique) se

1. *Deutsche Medic. Wochenschrift*, 1883.
2. *Bacteriologische Studien zur Typhus-Aetiologie*, *München*, 1886.
3. *Centralblatt für Klinis. Medicin.*, 1887.
4. *Centralblatt für Bakteriologie*, 1890, p. 279.
5. *Centralblatt für Bakteriologie*, 1889.
6. Fièvre typhoïde (*Traité de médecine, etc.*), p. 752.
7. J'ai eu souvent l'occasion de faire, avec le contenu de l'intestin des animaux, des plaques couvertes de colonies de *B. coli*, qui se développaient sans rougir le substratum bleu, mais qui, par transports successifs en bouillon lactosé, finissaient par faire fermenter énergiquement le sucre de lait (voir 2e mémoire). D'un autre côté, Silvestrini, lui aussi, dans un de ses mémoires (*Rivista gen. italiana di Clinica med.*, 1892) déclare que le rougissement de la gélose lactosée au tournesol peut être obtenu également en cultivant un bacille typique du typhus (page 27).

multiplie extraordinairement dans l'intestin durant la fièvre typhoïde, s'infiltre dans la sous-muqueuse, envahit les organes lymphatiques les plus proches, et finit par arriver presque toujours jusqu'à la rate!

A la rigueur, on pourrait soutenir que le vrai bacille typhique n'a jamais été isolé, ni des déjections des typhiques, ni des altérations anatomiques de l'intestin. Je ne veux pas dire, toutefois, qu'il ne puisse un jour y être trouvé, mais il n'en reste pas moins ceci : si la fièvre typhoïde est une maladie qui a son origine et son point de départ dans le tube digestif, pourquoi n'y rencontre-t-on pas le microbe spécifique dès l'origine, avant les symptômes et les lésions de la maladie? Nous sommes donc amenés à croire que l'infection typhique n'a pas son siège dans l'intestin, et nous savons, par contre, que le bacille d'Eberth qui a pénétré dans l'organisme (peu importe par quelle voie), peut être entraîné par le courant sanguin ou lymphatique, ou bien par les leucocytes, dans la rate et dans les autres organes du système lymphatique, pour y commencer la période de pullulation et de lente intoxication générale qui caractérisent le type de la maladie. Nous avons étudié ce poison, et nous avons vu à quelles altérations, à quelles manifestations morbides il peut donner lieu dans l'organisme. Les principales sont localisées dans l'intestin, et ressemblent absolument aux lésions anatomiques du typhus abdominal.

Outre cela, nous avons vu que la muqueuse intestinale, à l'état normal, n'absorbe pas facilement le poison typhique; par conséquent, les premiers signes de l'intoxication typhique de l'homme, désignés sous le nom de *période d'intoxication, malaise prodromique*, etc., doivent être regardés non comme dus à l'absorption de la part de l'intestin, qui est tout à fait intact et ne contient pas de bacilles spécifiques, mais comme la conséquence du poison qui commence à être éliminé par les microbes déjà pullulants dans la rate et, peut-être, dans d'autres organes lymphatiques internes. Ces premiers phénomènes, caractérisés par la réaction fébrile (qui représente le signe le plus exact et le plus constant de l'intoxication durant l'entière période de la maladie), sont suivis de toutes les manifestations locales dont nous avons reconnu la cause. L'intestin reste frappé en première ligne; il s'y produit hyperhémies, congestions, infil-

trations lymphatiques interstitielles des parois, tuméfactions des follicules lymphatiques, nécrose de l'épithélium de revêtement, hémorragies, entérites, etc.

Cependant le *bacille coli* de l'intestin se multiplie excessivement, acquiert et exalte ses propriétés pathogènes et fermentatives; il se produit des gaz, et les parois intestinales, déjà frappées de paralysie toxique, se laissent distendre et deviennent douloureuses. Plus la maladie est de longue durée, plus sont graves les conséquences de l'intoxication sur les organes frappés.

C'est ainsi que, vers le dixième ou le douzième jour, une teinte jaunâtre superficielle annonce la mortification ou la nécrose toxique des follicules lymphatiques, suivie bientôt des ulcérations caractéristiques sur l'origine desquelles on a tant discuté.

Mais nous avons vu que les effets de la toxine typhique ne se font pas sentir seulement sur la muqueuse intestinale; ils se manifestent, avec plus ou moins d'intensité, sur toutes les muqueuses de l'organisme.

La diffusion et l'activité de cette toxine sont si rapides et s'exercent à une telle distance qu'elles atteignent jusqu'aux organes des fœtus dans le sein maternel.

Hastelius [1] a observé, dans un fœtus de 8 mois, né d'une femme malade de fièvre typhoïde, la rate hyperhémique, les follicules de l'intestin et les ganglions lymphatiques du mésentère gravement infiltrés. Et cependant, aucun véhicule ne devait avoir rendu possible la colonisation du bacille d'Eberth dans le canal intestinal de ce fœtus! D'autre part, nous savons combien est difficile, pour les microbes, le passage du filtre placentaire.

On ne doit donc pas s'étonner si ce puissant poison exerce son action sur une autre muqueuse, très sensible, de l'organisme fébricitant : la muqueuse respiratoire.

Ainsi, dans la fièvre typhoïde, les bronches et les alvéoles pulmonaires sont frappées de catarrhe avec congestion des vaisseaux et de la sous-muqueuse, ce qui rend l'organe entier susceptible de toutes les lésions inflammatoires, congestions,

1. Cité par Eichorst, *Pathologie interne*, t. IV, p. 384.

atélectasies, pneumonies hypostatiques et pneumonies fibrineuses, dues à la facilitation de l'invasion secondaire du pneumocoque ou d'autres microbes, parmi lesquels peut être aussi le bacille typhique.

On sait même que le catarrhe bronchial prend, dans la fièvre typhoïde, une certaine valeur diagnostique, spécialement dans les cas légers, où il s'agit d'établir la distinction entre la fièvre typhoïde et un simple catarrhe gastro-intestinal. En effet, les glandes bronchiales, elles aussi, présentent une infiltration égale à celle des glandes mésentériques [1].

Le larynx également est presque toujours attaqué ; il présente la mortification de la muqueuse, des congestions, des processus inflammatoires, des ulcérations, des escarres gangréneuses de l'épiglotte, des dégénérescences musculaires, des nécroses, etc.

Dès que les premiers phénomènes toxiques apparaissent, on voit également entrer en scène les lésions de la muqueuse de la bouche, de l'arrière-bouche et du pharynx; c'est pourquoi on a : rougeur de la gorge, grossissement des amygdales et souvent angines catarrhales, sur lesquelles l'immigration d'autres germes établit de véritables processus croupaux et dipthéritiques, qui peuvent se propager par contagion.

Très probablement aussi, les néphrites, les épistaxis, les métrorrhagies, les cystites, les cholécystites, les endométrites, etc., qui accompagnent plus ou moins fréquemment les différents stades de la fièvre typhoïde, doivent être produites, ou du moins favorisées par l'action de la toxine typhique sur la muqueuse des organes respectifs.

On ne doit pas considérer autrement l'exanthème, sous forme de rougeole, qui se manifeste dans les cas les plus graves et qui, suivant Neuhauss, serait dû à des embolies capillaires de bacilles !

Ces bacilles n'ont jamais été trouvés; mais, d'autre part, nous avons vu se produire exactement cette éruption chez le singe, à la suite de l'injection des seules toxines typhiques. Son origine toxique, du reste très facilement explicable, ne peut donc être mise en doute.

Dans la fièvre typhoïde humaine, nous assistons donc au

1. Griesinger, *loc. cit.*, p. 268.

développement lent et successif d'un procès toxique si varié et si protéiforme dans sa durée, dans son intensité et dans ses conséquences, qu'il a rendu possibles toutes les interprétations, les définitions et les classifications multipliées, dont a été l'objet la fièvre typhoïde.

Du reste, nous sommes maintenant en état de comprendre l'origine d'une symptomatologie si riche et si variée. Dans ce travail, nous avons parlé à plusieurs reprises de l'accoutumance de l'organisme au poison typhique; nous avons vu que cette accoutumance ne peut s'obtenir que dans des organes déterminés (intestin) et que, dans quelques cas, chez l'homme, elle doit être considérée comme tout à fait naturelle ou acquise sans l'intervention d'une intoxication typhique antécédente.

L'accoutumance intestinale des cobayes, obtenue au moyen de l'injection de poisons putrides, constitue l'exemple le plus démonstratif de cet important phénomène.

Après cela on ne devra plus s'étonner des multiples aspects d'un tableau morbide placé sous la dépendance de coefficients si disparates: quantité du poison produit par le bacille d'Eberth, sensibilité des divers organes qui doivent en subir l'action, manifestations toxiques et infectieuses de la part du *B. coli* intestinal, qui devient virulent, pathogène et tend à envahir l'organisme.

L'intestin n'est plus protégé par le revêtement épithélial; c'est pourquoi le libre passage des microbes et surtout l'absorption de leurs poisons ne trouvent aucune sorte d'obstacle.

La diarrhée typhique, provoquée par les lésions toxiques de la muqueuse, est certainement maintenue et aggravée par le *B. coli*.

L'extraordinaire multiplication de ce dernier et sa tendance à détruire tous les autres microbes et à rester le seul représentant des espèces bactériennes intestinales, sont le résultat d'un travail biologique actif, incessant et complexe, dont les dernières conséquences ne doivent certainement pas rester indifférentes pour l'organisme malade qui est contraint de les subir.

Lorsque la quantité du poison typhique a fini par atteindre la limite extrême de tolérance générale, indépendamment de la plus ou moins grande extension des lésions locales, la réaction

de l'organisme est vaincue, la fièvre cesse et la période du collapsus commence.

C'est précisément cette période de collapsus, c'est-à-dire la dernière phase de l'infection typhique, que nous reproduisons expérimentalement chez les animaux.

Chez eux, le virus typhique se généralise et manifeste ses effets trop rapidement pour pouvoir donner le temps à l'organisme de réagir par la fièvre dans les premières périodes de l'intoxication.

Si le bacille d'Eberth pouvait fabriquer sa toxine dans l'organisme humain avec la même intensité que les vibrions cholériques produisent la leur, la fièvre typhoïde serait, comme le choléra, une maladie courte et apyrétique.

Et ainsi tombe la dernière objection faite contre le bacille d'Eberth, et tirée de l'impossibilité où on est de reproduire avec lui, chez les animaux, le lent et caractéristique processus pyrétique qui est particulier à la race humaine.

APPENDICES

N° 1.

Expériences sur l'accoutumance intestinale des cobayes au poison typhique, obtenue avec les injections gastriques de cultures typhiques stérilisées.

COBAYES	31 VI Poids gr. :	31	1 VII	2	3	4	5 VII Poids gr. :	Inoculation du virus dans le péritoine	RÉSULTAT
		INJECT. GASTRIQUES DE c. c.							
44	365	4	4	4	4	4	340	11 VII	Meurt en 12 h. Absence de lésions intestinales.
45	290	4	4	4	4	4	270	14 VII	Meurt en 18 h. Absence de lésions intestinales.
46	340	4	4	4	4	4	340	—	Tué.
47	310	4	4	4	4	4	300	13 VII	Meurt en 12 h. Absence de lésions intestinales.
48	390	4	4	4	4	4	375	15 VII	Meurt en 24 h. Viscères légèrement congestionnés.
49	410	4	4	4	4	4	405	9 VII	Meurt en 16 h. Absence de lésions intestinales.
50	385	4	4	4	4	4	370	20 VII	Meurt en 18 h. Viscères un peu congestionnés.
51	360	4	4	4	4	4	360	—	Tué.
52	420	4	4	4	4	4	420	1 VIII	A survécu.
53	400	4	4	4	4	4	385	17 VII	Meurt en 14 h. Absence de lésions intestinales.

COBAYES	31 VI Poids gr. :	31	1 VII	2	3	4	5 VII Poids gr. :	RÉSULTAT	Inoculation du virus dans le péritoine.	RÉSULTAT
		INJECT. SOUS-CUTANÉES DE c. c.								
54	270	4	4	4	4	4	205	Meurt le 7 VII	»	»
55	385	4	4	4	4	4	267	Meurt le 7 VII	»	»
56	350	4	4	4	4	4	250	A survécu	11 VIII	A survécu (vacciné).
57	325	4	4	4	4	4	230	Meurt le 9 VII	»	»
58	400	4	4	4	4	4	210	A survécu	22 VIII	A survécu (vacciné).
59	395	4	4	4	4	4	280	Meurt le 8 VII	»	»

N° 2.

Expériences sur l'accoutumance intestinale des cobayes au poison typhique obtenue avec les injections sous-cutanées de poisons putrides.

COBAYES	15 VIII	15	16	17	18	19	20	21	22	25	28	30	1 IX	Inoculation du virus dans le péritoine.	RÉSULTAT
	Poids gr. :	INJECT. SOUS-CUTANÉES DE POISON PUTRIDE c. c.											Poids gr. :		
86	750	—	1	2	3	3	3	3	3	3	4	4	690	12 IX	Meurt en 14 h. Absence de lésions intestinales.
87	600	—	1	2	3	3	3	3	3	3	4	4	530	4 IX	Meurt en 24 h. Absence de lésions intestinales.
88	580	—	1	2	3	3	3	3	3	3	4	4	515	6 IX	Meurt en 16 h. Absence de lésions intestinales.
89	390	—	1	2	3	3	3	3	3	3	4	4	320	»	»
90	425	1	1	2	3	3	3	3	3	3	4	4	365	21 IX	Meurt en 20 h. Absence de lésions intestinales.
91	480	—	1	2	3	3	3	3	3	3	4	4	450	»	»
92	520	—	1	2	3	3	3	3	3	3	4	4	485	18 IX	Meurt en 12 h. Absence de lésions intestinales.
93	430	—	1	2	3	3	3	3	3	3	4	4	390	9 IX	Meurt en 18 h. Absence de lésions intestinales.

N° 3.

Expériences qui démontrent que, chez les cobayes déjà vaccinés, peut subsister l'accoutumance de l'intestin au poison typhique, après qu'a été perdue l'immunité contre la fièvre typhoïde expérimentale.

I. Cobaye de 450 grammes. Déjà vacciné au mois de juin et qui a survécu à l'inoculation intrapéritonéale d'un virus très actif. Le 15 août on lui inocule, dans le péritoine, 1 c. c. d'une culture typhique très virulente. Il meurt en 12 heures, d'infection générale, mais ne présente aucune lésion intestinale.

II. Cobaye de 390 grammes. Déjà vacciné au mois de juin, et qui a survécu comme plus haut. Le 29 septembre on lui inocule, dans le péritoine, 0,5 c. c. d'un exsudat péritonéal très virulent, en même temps qu'à un 2e cobaye de contrôle, de 378 grammes. Ils meurent tous deux en 12 heures.

Chez le 1er cobaye, il y a absence complète de réaction intestinale; chez le 2e cobaye on a le tableau abdominal typique de la fièvre typhoïde expémentale.

III. Cobaye de 425 grammes. Déjà vacciné au mois de juin et ayant survécu, comme ci-dessus. Le 5 septembre, on lui inocule, dans le péritoine, en même temps qu'à un 2e cobaye de contrôle de 440 grammes, 0,5 c. c. d'une culture typhique très active.

Ils meurent tous deux en 14 heures. Chez le 1er cobaye il n'y a pas de lésions abdominales; chez le 2e, au contraire, elles apparaissent comme dans les infections typiques ordinaires.

N° 4.

Virulence du bacille typhique dans le péritoine des cobayes vaccinés.

I. Cobaye vacciné, de 320 grammes. Injection, dans le péritoine, de 1 c. c. d'une culture en bouillon qui tue en 20 heures environ. On sacrifie le cobaye au bout de 48 heures, et, du péritoine, on tire une culture en bouillon qui, le jour suivant, est inoculée (0,5 c. c.) à un cobaye *neuf* de 350 grammes, lequel meurt en 18 heures.

II. Cobaye vacciné, de 295 grammes. Injection, dans le péritoine, de 1 c. c. d'une culture en bouillon qui tue en 24 heures. On sacrifie le cobaye au bout de 48 heures, et, du péritoine, on tire une culture en bouillon qu'on inocule le jour suivant (0,5 c. c.) à un cobaye *neuf* de 280 grammes, lequel meurt en 16 heures.

III. Cobaye vacciné, de 410 grammes. Injection, dans le péritoine, de 1 c. c. d'une culture en bouillon qui tue en 24 heures environ. Le cobaye est sacrifié au bout de 3 jours et, du péritoine, on tire une culture en bouillon qu'on inocule, le jour suivant (0,5 c. c.) à un cobaye *neuf*, lequel meurt au bout de 10 heures.

IV. Cobaye vacciné, de 310 grammes. Injection, dans le péritoine, de 1 c. c. de la même culture que ci-dessus. On tue le cobaye au bout de 3 jours, et, du péritoine, on tire une culture en bouillon, qu'on inocule le jour suivant (0,5 c. c.) à un cobaye *neuf* de 330 grammes, lequel meurt en 12 heures.

V. Cobaye vacciné, de 360 grammes. Injection, dans le péritoine, de 1 c. c. d'une culture en bouillon, qui tue en 24 heures environ. Le cobaye est sacrifié au bout de 6 jours et, du péritoine, on tire une culture en bouillon, qu'on inocule le jour suivant (0,5 c. c.) à un cobaye *neuf* qui meurt en 8 heures.

N° 5.

Expériences qui démontrent l'absence de pouvoir antitoxique dans l'organisme des cobayes vaccinés contre la fièvre typhoïde expérimentale.

I. Cobaye vacciné n° 1 (285 grammes). Il est inoculé sous la peau, avec 2,8 c. c. de toxines (1 0/0 du poids). Meurt au bout de 24 heures.

II. Cobaye vacciné n° 1 (310 grammes). Il est inoculé sous la peau avec 3 c. c. de toxines (1 0/0 du poids). Meurt au bout de 24 heures.

III. Cobaye vacciné n° 1 (265 grammes). Il est inoculé sous la peau avec 4 c. c. de toxines (1,5 0/0 du poids). Cobaye *neuf* n° 2 (270 grammes), *de contrôle;* il est également inoculé sous la peau avec 4 c. c. de toxines (1,5 0/0 du poids). Le cobaye n° 1 meurt au bout de 5 heures; le cobaye n° 2, au bout de 8 heures.

IV. Cobaye vacciné n° 1 (320 grammes). Il est inoculé sous la peau avec 4,3 c. c. de toxines (1,5 0/0 du poids). Cobaye *neuf* n° 2 (310 grammes) *de contrôle;* il est également inoculé, avec la même dose. Le cobaye n° 1 meurt au bout de 8 heures; le cobaye n° 2, au bout de 9 h. 30.

V. Cobaye vacciné nº 1 (350 grammes). Il est inoculé, sous la peau, avec 5,2 c. c. (1,5 0/0 du poids) de toxines. Cobaye *neuf* nº 2 (385 grammes), *de contrôle;* il est inoculé avec 5,7 c c. de toxines (1,5 0/0 du poids). Le cobaye nº 1 meurt au bout de 9 heures; le cobaye nº 2 au bout de 12 heures.

VI. Cobaye vacciné nº 1 (225 grammes). Il est inoculé, sous la peau, avec 3,4 c. c. de toxines (1,5 0/0 du poids). Cobaye *neuf* nº 2 (248 grammes), *de contrôle;* il est inoculé également avec 3,7 c. c. de toxines (1,5 0/0 du poids).

Le cobaye nº 1 et le cobaye nº 2 meurent en 7 heures environ.

VII. Cobaye vacciné nº 1 (450 grammes). Il est inoculé, sous la peau, avec 6,7 c. c. de toxines (1,5 0/0 du poids). Cobaye *neuf* nº 2 (425 grammes), *de contrôle;* il est inoculé également 6,4 c. c. de toxines (1,5 0/0 du poids).

Le cobaye nº 1 meurt au bout de 8 h. 30; le cobaye nº 2, au bout de 12 heures.

Nº 6.

Expériences qui démontrent l'absence de pouvoir antitoxique (in vitro) *dans le sérum des cobayes vaccinés.*

I. Cobaye nº 1 (280 grammes). Il est inoculé, sous la peau, avec 4,2 c. c. de toxines (1,5 0/0 du poids) mêlées avec 5 c. c. de sérum d'un cobaye vacciné. Cobaye nº 2 (300 grammes), *de contrôle;* il est inoculé, sous la peau, avec 4,5 c. c. de toxines (1,5 0/0 du poids). Le cobaye nº 1 meurt au bout de 8 heures, le cobaye nº 2, au bout de 9 heures.

II. Cobaye nº 1 (255 grammes). Il est inoculé, sous la peau, avec 3,7 c. c. de toxines (1,5 0/0 du poids) mêlées avec 8 c. c. de sérum d'un cobaye vacciné. Cobaye nº 2 (275 grammes), *de contrôle;* il est inoculé, sous la peau, 4 c. c. de toxine (1,5 0/0 du poids). Les 2 cobayes meurent en 12 heures.

III. Cobaye nº 1 (310 grammes). Il est inoculé, sous la peau, avec 4,5 c. c. de toxines (1,5 0/0 du poids) mêlées avec 10 c. c. de sérum d'un cobaye vacciné. Cobaye nº 2 (325 grammes), *de contrôle*; il est inoculé avec 4,8 c. c. de toxines (1,5 0/0 du poids). Le cobaye nº 1 meurt au bout de 6 heures, le cobaye nº 2, au bout de 14 heures.

IV. Cobaye nº 1 (350 grammes). Il est inoculé, sous la peau, avec 3,5 c. c. de toxines (1 0/0 du poids) mêlées avec 8 c. c. de sérum d'un cobaye vacciné. Cobaye nº 2 (390 grammes), *de contrôle ;* il est inoculé avec 3,9 c. c. de toxines. On trouve les deux cobayes morts au bout de 24 heures.

V. Cobaye nº 1 (410 grammes). Il est inoculé, sous la peau, avec 4 c. c. de toxines (1 0/0 du poids) mêlées avec 6 c. c. de sérum d'un cobaye vacciné. Cobaye nº 2 (425 grammes), *de contrôle;* il est inoculé avec 4,2 c. c. de toxines (1 0/0 du poids). Le cobaye nº 1 meurt au bout de 36 heures, le cobaye nº 2, au bout de 24 heures.

VI. Souris nº 1 (17 grammes). Est inoculée, sous la peau, avec 1 c. c. de toxines mêlées avec 1 c. c. de sérum d'un cobaye vacciné. Souris nº 2 (18gr,5), *de contrôle.* Est inoculée, sous la peau, avec 1 c. c. de toxines seules. Les deux souris meurent en 24 heures.

VII. Souris nº 1 (20 grammes). Est inoculée sous la peau, avec 1 c. c. de

toxines mêlées avec 2 c. c. de sérum d'un cobaye vacciné. Souris n° 2 (18 grammes) *de contrôle*. Est inoculée, sous la peau, avec 1 c. c. de toxines seules. La souris n° 1 meurt au bout d'une heure, la souris n° 2 meurt en 12 heures.

VIII. Souris n° 1 (16gr,5). Est inoculée sous la peau, avec 0,8 c. c. de toxines mêlées avec 2 c. c. de sérum d'un cobaye vacciné. Souris n° 2 (17 grammes), *de contrôle;* est inoculée avec 0,8 c. c. de toxines seules. La souris n° 1 meurt au bout de 16 heures, la souris n° 2 au bout de 12 heures.

IX. Souris n° 1 (19 grammes). Est inoculée, sous la peau, avec 0gr,8 de toxines mêlées avec 2 c. c. de sérum d'un cobaye vacciné. Souris n° 2 (19gr,5), *de contrôle;* est inoculée, sous la peau, avec 0,8 c. c. de toxines seules. Les deux souris meurent le jour suivant.

X. Souris n° 1 (18gr,5). Est inoculée dans le péritoine, avec 0,2 c. c. de toxines mêlées avec 0,8 c. c. de sérum de cobaye vacciné. Souris n° 2 (17 grammes), *de contrôle;* est inoculée, dans le péritoine, avec 0,2 c. c. de toxines seules. La souris n° 1 meurt au bout de 24 heures, la souris n° 2, au bout de 16 heures.

XI. Souris n° 1 (20 grammes). Est inoculée dans le péritoine, avec 0,2 c. c. de toxines mêlées avec 2 c. c. de sérum de cobaye vacciné. Souris n° 2 (18 grammes), *de contrôle;* est inoculée, dans le péritoine, avec 0,2 c. c. de toxines seules. La souris n° 1 survit, la souris n° 2 meurt au bout de 24 heures.

XII. Souris n° 1 (17gr,5). Est inoculée, dans le péritoine, avec 0gr,2 de toxines mêlées avec 2 c. c. de sérum de cobaye vacciné. Souris n° 2 (18 grammes), *de contrôle;* est inoculée, dans le péritoine, avec 0,2 c. c. de toxines seules. Les deux souris meurent au bout de 24 heures.

XIII. Souris n° 1 (15 grammes). Est inoculée, dans le péritoine, avec 0,1 c. c. de toxines mêlées avec 1,5 c. c. de sérum de cobaye vacciné. Souris n° 2 (16gr,5), *de contrôle;* est inoculée dans le péritoine avec 0,1 c. c. de toxines seules. La souris n° 1 survit, la souris n° 2 meurt au bout de 36 heures.

XIV. Souris n° 1 (22 grammes). Est inoculée, dans le péritoine, avec 0,4 c. c. de toxines mêlées avec 3 c. c. de sérum de cobaye vacciné. Souris n° 2 (20 grammes), *de contrôle;* est inoculée avec 0,4 c. c. de toxines seules. Les deux souris meurent en 24 heures.

XV. Souris n° 1 (16 grammes). Est inoculée dans le péritoine, avec 0,3 c. c. de toxines mêlées avec 1,5 c. c. de sérum de cobaye vacciné. Souris n° 2 (16gr,5) *de contrôle;* est inoculée dans le péritoine, avec 0,3 c. c de toxines seules. La souris n° 1 meurt au bout de 3 heures, la souris n° 2 au bout de 2 h. 30.

XVI. Souris n° 1 (15 grammes). Est inoculée dans le péritoine, avec 0,1 c. c. de toxines mêlées avec 1 c. c. de sérum de cobaye immunisé. Souris n° 2 (15 grammes), *de contrôle;* est inoculée, dans le péritoine, avec 0,1 c. c. de toxines seules. Les deux souris meurent en 24 heures.

XVII. Souris n° 1 (19 grammes). Est inoculée dans le péritoine, avec 0,4 c. c. de toxines mêlées avec 1,5 c. c. de sérum de cobaye vacciné.

Souris n° 2 (17gr,5), *de contrôle;* elle est inoculée dans le péritoine, avec 0,4 c. c. de toxines seules. La souris n° 1 meurt au bout de 11 heures, la souris n° 2 au bout de 8 heures.

N° 7.

Expériences qui démontrent l'absence de pouvoir antitoxique (IN VITRO) *dans le sérum de lapin hypervacciné.*

I. Cobaye n° 1 (320 grammes). Il est inoculé, sous la peau, avec 4,8 c. c. de toxines (1,5 0/0 du poids) mêlées avec 9,6 c. c. de sérum d'un lapin hypervacciné. Cobaye n° 2 (345 grammes), *de contrôle;* il est inoculé, sous la peau, avec 5,2 c. c. de toxines seules (1,5 0/0) du poids).

Le cobaye n° 1 meurt en 14 heures, le cobaye n° 2 en 9 heures.

II. Cobaye n° 1 (410 grammes); il est inoculé, sous la peau, avec 6,1 c.c. de toxines (1,5 0/0 du poids) mêlées avec 12 c. c. de sérum de lapin hypervacciné. Cobaye n° 2 (420 grammes), *de contrôle;* il est inoculé, sous la peau, avec 6,2, de toxines seules.

Le cobaye n° 1 meurt en 8 heures, le cobaye n° 2 en 10 heures.

III. Cobaye n° 1 (400 grammes). Il est inoculé, sous la peau, avec 6 c. c. de toxines (1,5 0/0 du poids) mêlées avec 18 c. c. de sérum de lapin hypervacciné. Cobaye n° 2 (380 grammes), *de contrôle;* il est inoculé, avec 5,7 c. c. de toxines seules.

Le cobaye n° 1 meurt en 16 heures, le cobaye n° 2 en 9 heures.

N° 8.

Expériences comparatives, touchant l'action toxique sur les muqueuses, entre les toxines typhiques et les toxines du B. coli.

I. Cobaye n° 1 (295 grammes) et cobaye n° 2 (320 grammes).

(14 août). Injection endo-utérine de 1 c. c. de culture en bouillon de *B. coli* virulent.

Les deux cobayes ont survécu. Le 20 août, on sacrifie le cobaye n° 2 ; à l'autopsie on ne rencontre aucune lésion appréciable; les cultures du péritoine restent stériles; de la culture de la cavité utérine on obtient le développement de deux seules colonies de *B. coli.*

II. Cobaye n° 1 (335 grammes) et cobaye n° 2 (360 grammes).

(29 août). Injection endo-utérine de 1 c. c. d'une culture en bouillon de *B. coli* virulent, et injection sous-cutanée consécutive de 4 c. c. de vieilles cultures stérilisées de *B. coli.* Cette injection est ensuite répétée pendant quatre autres jours, c'est-à-dire jusqu'au 4 septembre, où on trouva morts les deux cobayes.

Les cultures du péritoine restèrent stériles; les cultures de la cavité utérine démontrèrent la présence de quelques colonies de *B. coli.*

III. Cobaye n° 1 (350 grammes) et cobaye n° 2 (430 grammes).

(29 août). Injection endo-utérine de 1 c. c. de culture en bouillon de *B. coli* virulent et injection sous-cutanée consécutive de 4 c. c. de vieilles cultures typhiques stérilisées.

Le matin suivant, on trouve morts les deux cobayes.

A l'autopsie, on rencontre un abondant exsudat péritonéal très riche de *B. coli;* les cultures de la rate, du sang, du cœur et de la cavité utérine démontrent la présence du microbe en grande abondance.

N° 9.

Expériences pour obtenir l'accoutumance intestinale des cobayes au poison typhique, au moyen des injections gastriques de cultures stérilisées du B. coli.

COBAYES	29 VIII Poids gr. :	29	30	31	2 IX	3	4 IX Poids gr. :	INOCULATION du VIRUS	RÉSULTAT
		INJ. GASTRIQUE DE c. c.							
101	410	4	4	4	4	4	390	13 IX	Meurt en 10 h. Lésions intestinales graves.
102	400	4	4	4	4	4	375	16 IX	Meurt en 8 h. Lésions intestinales graves.
103	370	4	4	4	4	4	370	4 IX	Meurt en 16 h. Lésions intestinales graves.
104	355	4	4	4	4	4	320	8 IX	Meurt en 10 h. Lésions intestinales graves.
105	430	4	4	4	4	4	445	»	»
106	455	4	4	4	4	4	430	21 IX	Meurt en 12 h. Lésions intestinales graves.

COBAYES	29 VIII Poids gr. :	29	30	31	2 IX	3	4 IX Poids gr. :	RÉSULTAT	INOCULATION du VIRUS	RÉSULTAT
		INJ. SOUS-CUTANÉES DE c. c.								
107	365	4	4	4	4	4	270	Meurt le 5.	—	»
108	380	4	4	4	4	4	295	—	13 IX	A survécu.
109	405	4	4	4	4	4	320	—	9 IX	A survécu.
110	450	4	4	4	4	4	365	—	21 IX	A survécu.
111	390	4	4	4	4	4	—	Meurt le 4.	—	»
112	375	4	4	4	4	4	310	Meurt le 8.	—	»

ÉTUDE EXPÉRIMENTALE SUR LE CHARBON SYMPTOMATIQUE

ET SES RELATIONS AVEC L'ŒDÈME MALIN

PAR LE DOCTEUR HERMANN DUENSCHMANN.

(Travail du Laboratoire de M. Roux, à l'Institut Pasteur.)

Le *bacterium Chauvæi*, qui provoque la maladie du gros bétail connue sous le nom de charbon symptomatique (*Rauschbrand*), et le vibrion septique de M. Pasteur, qui est la cause de l'œdème malin, sont des microbes contre lesquels il n'est pas difficile de vacciner les différentes espèces animales [1]. Depuis que M. Behring a constaté les surprenantes qualités antitoxiques et préventives dont jouit le sérum des animaux vaccinés contre le tétanos et la diphtérie, on a commencé à examiner les propriétés du sérum des animaux immunisés contre d'autres maladies qui se prêtent à une étude expérimentale, telles que le choléra, la fièvre typhoïde, la pneumonie à diplocoques (Talamon-Frænkel), le *hog-choléra*, etc. Il était donc très intéressant de faire la même étude pour le charbon bactérien et la septicémie.

On sait, depuis les travaux de MM. Roux et Chamberland, qu'il est facile de conférer l'immunité contre ces deux maladies, au moyen des substances solubles élaborées par les microbes qui les causent. En même temps, M. Roux a pu constater que les cobayes, vaccinés contre le charbon symptomatique, étaient immunisés aussi contre le vibrion septique. M. Kitasato n'a pas pu vérifier ce point. C'est pourquoi nous avons voulu l'examiner à nouveau.

L'étude d'une maladie expérimentale devient surtout fructueuse, quand on peut séparer des corps microbiens les substances toxiques qu'ils élaborent. M. Roux a déjà montré comment on peut préparer la toxine du vibrion septique.

1. Voir à ce sujet le travail classique de MM. ARLOING, CORNEVIN et THOMAS sur le *Charbon symptomatique*.

Cette toxine, injectée dans le péritoine, tue rapidement le cobaye, à la dose de 40 c. c.; elle le fait mourir cachectique, à la dose de 20 c.c. dans un temps beaucoup plus long. Mais la toxine du charbon symptomatique, préparée de la même façon, ne tué plus le cobaye à cette dose. On comprend aisément que l'interprétation des causes de la mort soit malaisée, quand la dose mortelle est supérieure à 20 c. c.; en tout cas, l'expérimentation avec un tel liquide devient très difficile. Il entrait donc dans notre tâche de trouver un procédé pour préparer une toxine plus puissante et plus maniable. Nous avons pensé que, si nous y arrivions pour le charbon symptomatique, la chose serait encore plus facile pour le vibrion septique. C'est pourquoi nous avons commencé par le *bacterium Chauvæi*. Cela a encore un autre avantage. On sait que le lapin est ordinairement réfractaire au charbon symptomatique, bien qu'il y en ait toujours qui succombent à cette maladie. Nous n'avions donc qu'à renforcer l'immunité naturelle de ces animaux, en leur inoculant, à diverses reprises, le charbon symptomatique, et à essayer ensuite si leur sang manifestait des qualités préventives.

Il importait, tout d'abord, d'avoir des microbes aussi virulents que possible, afin de préparer une toxine très énergique et d'obtenir des sérums très actifs. Nous avons commencé par renforcer notre virus.

I

RENFORCEMENT DU VIRUS DU CHARBON SYMPTOMATIQUE

Le virus avec lequel nous avons entrepris notre étude était précisément cette poudre vaccinante de M. Arloing, qui, délayée dans un peu d'eau et injectée dans la cuisse d'un cobaye, donne une tumeur non mortelle. A la suite de cette inoculation, l'animal est vacciné contre la maladie. On sait, d'après l'expérience classique de M. Arloing, qu'il suffit d'ajouter 0,5 c. c. d'une solution d'acide lactique au 1/5, à la dilution de la poudre vaccinante, pour qu'elle devienne sûrement mortelle.

Expérience. — Le 23 octobre, à 3 heures du soir, un gros cobaye mâle n° 38 (poids : 780 grammes) reçoit 0,5 c. c. du mélange mentionné dans les

muscles de la cuisse; l'animal meurt, avec tous les signes bien connus du charbon symptomatique, le lendemain à 5 heures, 26 heures après.

A l'autopsie nous constatons :

Dans la sérosité de la tumeur de la cuisse : des formes courtes du microbe (en bacille), avec de nombreuses spores en état de formation; ces dernières, tantôt au milieu du bacille (formes renflées), tantôt à l'extrémité du bacille (formes en battant de cloche). Très peu de liquide dans le péritoine, où nous trouvons les formes longues du microbe, en filaments qui traversent le champ d'observation, quelquefois d'un bout à l'autre. Dans le sang puisé dans le cœur, les bacilles sont très dificiles à trouver, mais ils n'y font jamais défaut.

Avec le sang de cet animal, resté 24 heures à 37°, nous avons inoculé un deuxième cobaye (sans acide lactique). Il en est mort en 18 heures. Avec le sang de celui-ci[1], nous avons pratiqué un troisième passage, et ainsi de suite un quatrième et un cinquième. On obtient ainsi un virus qui tue le cobaye, suivant les variations individuelles, au bout de 8 à 15 heures.

1. Pour puiser la semence, nous avons adopté le procédé pratiqué depuis longtemps à l'Institut Pasteur, avec des modifications insignifiantes. Nous croyons nécessaire de le décrire pour être complet :

1° On peut prendre le suc musculaire dans la tumeur charbonneuse. Si l'on veut en obtenir des quantités un peu considérables, on doit enlever la peau aseptiquement et faire de larges incisions dans la tumeur (avec un couteau flambé) pour laisser sortir le suc œdémateux; on l'aspire dans les petits tubes effilés bien connus qui sont étranglés un peu au-dessus de l'effilure et stérilisés au four à flamber. Ce suc est très riche en microbes ;

2° On peut aussi recueillir avec pureté de la sérosité péritonéale, à la condition de faire l'autopsie aussitôt après la mort, sans quoi, on pourra trouver dans cette sérosité des microbes étrangers qui ont traversé la paroi intestinale ;

3° C'est dans le sang du cœur qu'il est le plus facile de puiser un virus pur avec les petites pipettes déjà décrites. Ce procédé nous paraît de beaucoup le meilleur ; avec lui il ne nous est jamais arrivé d'accident.

Les petites pipettes sont remplies jusqu'au niveau de l'étranglement. On les ferme en ce point au bec de gaz, en laissant le moins possible d'espace libre. On obtient ainsi un milieu suffisamment anaérobie pour que les microbes contenus dans le sang pullulent à la température de 37°. Il est facile de s'en rendre compte. Si, après un séjour de 24 heures à l'étuve, on casse la pointe du tube, il se produit toujours une petite projection, ce qui prouve qu'il y a eu dans le tube une formation de gaz, due au développement des microbes. De plus, le sang, qui était sans odeur auparavant, prend à l'étuve cette odeur caractéristique d'acide butyrique dont parle M. Kitasato, et il devient alors facile d'y trouver les microbes (à l'état de spores). Pour plus de sûreté nous avons toujours ensemencé une gouttelette du sang dans du bouillon exposé à l'air. Ce bouillon, à l'étuve à 37°, ne doit pas se troubler.

C'est ce sang resté 12-24 heures à l'étuve qui nous a servi à inoculer les animaux. Seulement, pour éviter les inégalités du dosage, il faut toujours très bien broyer le caillot avant d'y puiser ; car le virus y est emprisonné. Mentionnons encore le fait que le sang enfermé dans les tubes clos garde sa pleine virulence pendant des mois.

II

RENFORCEMENT DE L'IMMUNITÉ DES LAPINS

C'est avec ce virus renforcé que nous avons expérimenté sur les lapins pour obtenir un sérum préventif.

Comme nous étions en plein inconnu, on comprend aisément que nos tâtonnements, pour trouver le meilleur procédé, nous aient coûté un grand nombre d'animaux.

Il y a trois procédés d'inoculation : injection du virus dans la veine de l'oreille, dans le péritoine, ou enfin dans les muscles de la cuisse; ce dernier mode d'inoculation est le plus dangereux. C'est pourquoi nous préférons inoculer la première fois dans le péritoine ou dans la veine de l'oreille. De cette façon on ne risque pas de voir succomber les lapins à la suite d'une tumeur charbonneuse, comme cela nous est arrivé une fois.

Nous avons ordinairement employé du sang charbonneux délayé dans 3-4 fois son volume d'eau stérilisée, et nous allons maintenant citer, à titre de renseignement, un cas typique de la marche de la maladie.

Expérience. — Le 12 janvier, le lapin n° 21 (poids : 1,950 grammes) reçoit 1,5 c. c. d'une dilution de sang au 1/4 dans le péritoine. Il commence à maigrir; le 14 : 1,670 grammes; le 16 : 1,530 grammes; le 22 : 1,670 grammes; le 26 : 1,630 grammes. Nous constatons de la diarrhée; le 28 : 1,500 grammes; le 29 : 1,390 grammes. Le 31 nous trouvons le lapin mort, avec une cachexie extrêmement prononcée.

Nous avons vu succomber de même des lapins après l'injection de 7 c. c. de cette dilution dans la veine de l'oreille, au bout de 25 jours; avec 5 c. c. dans la veine, au bout de 17 jours; avec 1 c. c. dans le péritoine au bout de 14 jours. Invariablement les lapins sont morts avec une diarrhée très forte.

On nous pardonnera d'avoir souvent été trop prompt à accuser la nourriture. La diarrhée est un des symptômes de la cachexie causée par la toxine qui se trouve toujours en quantité notable dans les tubes de sang charbonneux ainsi conservés à l'étuve. Ces lapins sont morts comme les cobayes auxquels, dans

nos expériences ultérieures, nous avons injecté la toxine que nous avons préparée.

Nos lapins mouraient d'autant plus sûrement que, pour les immuniser fortement, nous leur donnions des doses croissantes de virus, comme on le fait pour obtenir l'antitoxine diphtérique, par exemple. C'est un fait qui mérite d'être signalé que cette sensibilité à l'action du poison du charbon symptomatique chez un animal comme le lapin, qui est pour ainsi dire réfractaire au virus vivant.

Le procédé qui nous paraît aujourd'hui le meilleur pour obtenir un sang actif, c'est de commencer par l'injection de 0,5 c. c. d'une solution de sang charbonneux au 1/5, ou dans la veine ou dans le péritoine. Quand l'animal a repris son ancien poids, on peut répéter ces injections dans la veine ou le péritoine, ou bien se contenter d'une seule injection dans la substance musculaire de la cuisse. Il se forme alors un abcès dans cet endroit. Si on en recueille le pus avec des précautions aseptiques, et si on l'ensemence dans du bouillon ordinaire exposé à l'air, on n'obtient point de culture. Par contre, si, même trois semaines après l'inoculation, on aspire du pus dans des pipettes que l'on ferme à la lampe et qu'on mette celles-ci à l'étuve, il se fait dans leur intérieur une culture anaérobie de charbon symptomatique parfaitement légitime, virulente, riche en spores après quelques jours, dégageant des gaz et répandant l'odeur caractéristique.

C'est donc un fait analogue à celui observé par M. Metchnikoff, dans son étude sur le hog-choléra. Ce savant a montré que, dans les abcès qui se produisent chez les lapins vaccinés à la suite de l'inoculation d'épreuve, le microbe reste vivant et capable de tuer à petites doses les lapins neufs auxquels on l'inocule.

Nous avons vu ces abcès charbonneux persister jusqu'à 3 mois. Et il nous paraît évident que la présence de microbes virulents dans l'abcès équivaut à une injection continuelle de toxine, et contribue à augmenter les propriétés préventives du sang. D'un autre côté, l'injection de petites quantités de sang toxique, pendant la persistance des abcès, est extrêmement dangereuse. C'est un fait dont l'ignorance nous a coûté plusieurs animaux. En procédant ainsi, nous avons obtenu un sang actif avec 2 injections virulentes seulement.

Pour terminer, nous signalerons encore le fait curieux que des lapins en train de mourir cachectiques nous ont donné un sérum actif. C'est un fait qu'on a observé dans d'autres maladies, la dipthérie par exemple.

LISTE DES LAPINS VACCINÉS.

Lapin n° 8. — Le 12 novembre : 1,800 gr. : 0,5 c. c. dans la veine de l'oreille. (Les solutions du virus sont toujours au 1/3 — 1/4). Le 21 novembre : 2,050 gr. : 0,5 c.c. dans la veine de l'oreille; le 4 décembre 1,980 : 0,5 c.c. dans la veine de l'oreille; le 26 décembre : 1,0 c.c. dans la cuisse : le 2 janvier, 1,900 grammes; le 8 : 1,980 grammes; le 9 : 2,040. *Saignée*. Le 12 : 3, c.c. dans la cuisse, 2,000 grammes; le 14 : 1,720 grammes; le 16 : 1,700 le 20 : 1,760. Le lapin meurt le 21 janvier.

Lapin n° 10. — Le 22 décembre : 2,400gr. : 0,5 c.c. dans la cuisse. Tumeur très forte, nous le croyions perdu; le 2 janvier : 2,380; le 5, 2,360 : 1, c. c. dans la cuisse; le 8 : 2,270; le 11 : 2,370, 2 c.c. dans la cuisse; le 14 : 2,280; le 16 : 2,170; le 18 : 2,290; le 24 : 2,400. Dès lors il se porte toujours bien, tout en ayant dans la cuisse deux fistules suppurant qui ne se ferment qu'au commencement du mois de mars. C'est ce qui nous a empêché de le saigner. Le 15 mars, il est éprouvé avec 1/2 goutte de sang septique, ce qui ne lui a rien fait.

Lapin n° 11. — Le 22 décembre : 2,560 gr., 0,5 c. c. dans le péritoine; le 26 : 0,5 c.c. dans la cuisse. Le 2 janvier 2,750; le 5 : 2,640, 2, c. c. dans la cuisse; le 8 : 2,570; le 11 : 2,550; le 14 : 2,380; le 20 : 2,470; le 24 : 2,530. *Très forte saignée*. Le 28 : 2,300; le 30 : 2,180; le 1er février : 1,890 grammes. *Il est saigné à blanc.*

Lapin 15. — Le 29 décembre 1,810 gr. 0,5 c. c. dans la veine de l'oreille. Le 2 janvier : 1,600; le 8 : 1,530; le 11 : 1,350; le 15 : 1,200. Il est près de mourir. *Nous le saignons à mort.*

Lapin 16. — Le 2 janvier : 2,060 gr. 0,7 c. c. dans la veine de l'oreille; le 5 : 1,880, le 5 : 1,880, le 8 : 1,830; le 11 : 1,890, 1 c. c. dans la cuisse; le 14 : 1,600; le 18 : 1,730; le 22 : 1,800; le 26 : 1,750. *Nous prélevons un peu de sang*; le 29 : 1,610; le 30 : 1,800; le 1er février : 1,740; le 3 : 1,570; le 4 : 1,460, *nous le saignons à blanc.*

Lapin 23. — Le 8 décembre : 1,940 gr. 0,3 c. c. dans le péritoine; le 15 : 2, c. c. dans le péritoine; le 22 : *saigné*; le 26 : 1, c. c. dans la cuisse. Le 2 janvier : 1,500; le 5 : 1,400; le 8 : 1,300; le 9 : 1,209. *Il est saigné à blanc.*

Lapin 31. — Le 8 décembre 1,910 gr. 0,2c. c. dans la cuisse; le 15 : 1,0 dans la cuisse, 1,800 grammes. Le 2 janvier : 1,600 grammes; le 8 : 1,570 le 14 : 1,420; le 18 : 1,490; le 22 : 1,570; le 30 : 1,810; le 6 février 1,720. Il se rétablit complètement; mais il a encore un abcès le 2 mars, que nous trouvons ouvert le 14 mars. Il est éprouvé avec une goutte de sang septique le 18 mars.

III

PROPRIÉTÉS DU SÉRUM DES LAPINS IMMUNISÉS

Au début de nos expériences nous avons rencontré beaucoup de difficultés pour mettre en évidence le pouvoir préventif du sérum des lapins immunisés. Tout d'abord, nous avons constaté que le sérum est quelquefois toxique pour les cobayes avant de devenir immunisant. C'est ainsi que deux cobayes (n° 49 et 76), ont succombé à la suite de l'injection de 10 c. c. du sérum des lapins 16 et 23; qu'un autre cobaye (n° 66) a péri après avoir reçu 5 c. c. du sérum du lapin n° 23. Dans ces trois expériences, la mort est survenue en vingt-quatre heures environ, sans qu'on puisse l'attribuer à une infection microbienne quelconque. Plus tard, le sérum de ces mêmes lapins s'est montré préventif, notamment celui du lapin 23 qui, à la dose de 10 c. c., ne cause plus aucun mal aux cobayes.

Une autre circonstance qui nous a empêché tout d'abord de reconnaître la propriété préventive du sérum, c'est que nous éprouvions les cobayes qui l'avaient reçu avec des doses beaucoup trop fortes de virus.

Dans ces conditions les animaux traités mouraient toujours, mais avec quelques heures ou quelques jours de retard sur les témoins.

Expérience. — Le 10 janvier, le cobaye n° 60 (de 645 grammes) reçoit 10 c. c. de sérum du lapin 23, (retiré seize jours après la dernière inoculation) dans le péritoine. Le 13 à midi : nouvelle dose de 5 c. c. du même sérum; et, six heures plus tard, 0,2 c. c. d'une solution du virus au 1/6. Témoin cobaye n° 64. Le lendemain matin, nous trouvons le témoin mort, tandis que notre animal se porte encore assez bien; mais nous apercevons déjà à la cuisse une petite tumeur, qui va en augmentant, et il meurt le 17 avec un charbon symptomatique typique.

Mais voici les résultats obtenus avec des doses moindres de virus d'épreuve.

Expérience. — Le 16 janvier, un cobaye mâle n° 68 (poids 500 grammes) reçoit 7 c. c. de sérum du lapin 15 dans le péritoine; un autre n° 71 (de 530 grammes), 10 c. c. de sérum du lapin 20 (non vacciné), également dans le péritoine. Le 19, à six heures du soir, tous les deux et le témoin n° 78 sont inoculés dans les muscles de la cuisse chacun avec 0,05 d'une solution du virus au 1/20. N° 78, le témoin, meurt le lendemain à midi (18 heures

après l'inoculation); n° 71 (avec le sérum non actif) meurt dans la nuit du 20 au 21 (à peu près 12 heures après le témoin); et le n° 68 n'a qu'une petite tumeur à peine sensible. Il se rétablit complètement au bout de quelques semaines (le 25 janvier : 410 gr.; le 7 février : 460; le 24 février : 490).

Nous avons alors répété l'expérience avec des doses moindres du même sérum.

Expérience. — Le 20 janvier, le cobaye 90 (de 550 grammes), reçoit 6 c.c. de sérum du lapin 15 dans le péritoine. Le cobaye 92 (de 610 grammes), 2 c.c. Le 23, à six heures du soir, ils reçoivent, en même temps que le témoin n° 91, 0,1 d'une solution au 1/20 du virus dans la cuisse. Le lendemain matin, nous trouvons le témoin mourant; n° 90 a une tumeur légère dans la cuisse pendant quelques jours; n° 92 presque rien du tout.

La préservation est encore possible, mais elle est moins complète, si on fait l'inoculation d'épreuve peu de temps après l'injection du sérum préservatif.

Expérience. — Le 19 janvier, à onze heures du matin, nous injectons 4,0 c. c. de sérum du lapin 15 au cobaye n° 77 (490 gr.). Le soir à six heures, il est éprouvé avec 0,05 c.c. du virus (solution au 1/20). Il en meurt le 20, à huit heures du soir (huit heures après le témoin n° 78).

Nous nous sommes alors servi d'un autre sérum, retiré du lapin 11, sérum que nous supposions plus fort.

Expérience. — Le 25 janvier, nous inoculons 1 c. c. de ce sérum au cobaye n° 99 (de 510 grammes); le 27, 2 c.c., moitié dans le péritoine, moitié sous la peau, et 0,1 c. c. d'une solution du virus au 1/20 dans la cuisse. Le 28, nous constatons déjà une tumeur commençante qui, le 29, s'est agrandie et a déterminé un tel gonflement que nous croyons l'animal perdu. Cependant le gonflement reste stationnaire quelques jours, un abcès se forme et s'ouvre le 7 février (440 grammes). Le 10, nous croyons l'animal si bien portant (460 grammes) que nous nous décidons à prélever du sang. L'animal commence alors à maigrir et il meurt cachectique le 18 février [1].

Il est encore plus difficile de préserver les animaux si on leur injecte en même temps, mais en des points différents du corps, le virus et le sérum.

Expérience. — Le 31 janvier, le cobaye n° 109 (de 560 grammes) reçoit 1 c.c. de sérum du lapin 8 dans le péritoine, 1 c.c. sous la peau; le cobaye

1. L'expérience suivante démontre l'importance du dosage du virus. Le 27 et le 29, nous répétons l'expérience que nous venons de raconter, avec la seule différence que nous inoculons 0,5 c. c. au lieu de 0,1 c. c. du virus. Le cobaye 100, sujet de cette expérience, meurt en 36 heures.

n° 110 (de 660 grammes), les mêmes doses du sérum du lapin 11. Simultanément ils sont éprouvés avec 0,05 c. c. du virus (solution au 1/20). N° 109 meurt le 2 février à midi; n° 110, dans la nuit suivante.

Expérience. — Le 1er février, le cobaye 114 reçoit 2 c. c. de sérum du lapin 11 dans le péritoine, 1 c. c. sous la peau de la cuisse; 0,01 de la solution du virus au 1/20 (= 1/5 de la dose donnée à 109 et 110) dans la cuisse. Il en meurt le 3, à midi.

Décidément, nous avons mal réussi dans ces essais de préservation où le sérum de lapin est donné simultanément avec le virus. Ou le sérum est trop faible, ou les doses employées sont trop petites. Cependant, l'expérience suivante montre que tout réussit si on choisit le sang d'un autre espèce animale. On sait que plus une espèce est sensible à une maladie, plus elle donne ordinairement un sérum actif quand elle est immunisée. Puisque le cobaye est beaucoup plus sensible au charbon symptomatique que le lapin, nous avons encore fait une expérience avec le sérum du cobaye n° 55, qui est sûrement vacciné.

Expérience. — Le 9 février, nous en injectons au cobaye n° 130 (de 520 grammes) 2 c. c, dans le péritoine, 1 c. c. sous la peau; en même temps nous lui inoculons 0,05 c. c. d'une solution de sang au 1/20. Du 12 jusqu'au 15, nous trouvons, dans la cuisse infectée, un très fort gonflement qui ne commence à disparaître que vers le 18. Un mois après, le 9 mars, l'animal pèse 480 grammes.

Maintenant, nous allons parler de l'effet sur les animaux des mélanges de sérum préventif et de virus. Les résultats en sont beaucoup plus nets que ceux de l'inoculation séparée des deux substances. Nous attachions une grande importance à cette partie de nos recherches, parce que nous croyons que cette méthode pourrait être susceptible d'une application pratique dans beaucoup de cas.

Expérience : Le 16 janvier, nous ajoutons 0,05 c. c. de notre solution ordinaire du virus (au 1/20) à 1 c. c. de sérum du lapin 15, et nous injectons le mélange au cobaye 70 (de 550 grammes). A la suite il ne se produit qu'une légère diminution du poids. (Le 25 janvier, 460 grammes; le 7 février 540 grammes.)

C'était une expérience pour nous orienter. Nous l'avons répétée avec un témoin qui recevait, en même temps que le virus, du sérum de lapin non vacciné.

Expérience. — Le 17 janvier, la même dose du virus est ajoutée : 1° à 1 c. c. de sérum du lapin n° 8 (vacciné); 2° à 1 c. c. de sérum du lapin n° 20 (non vacciné). Le mélange 1 est injecté dans la cuisse du cobaye n° 72 pesant 600 grammes; le mélangé 2 est injecté au cobaye n° 73 (de 670 grammes), Le cobaye n° 72 ne montre aucun changement, pas trace de tuméfaction (le 7 février, 660 grammes); le n° 73 meurt le 18 janvier, vingt heures après l'inoculation.

Cette expérience est répétée le 24 janvier, à 5 heures du soir, dans les conditions suivantes :

Expérience. — 1° Le cobaye n° 96 (de 580 grammes) reçoit dans la cuisse 1 c.c. de sérum du lapin n° 8 mélangé avec 0,1 c. c. d'une solution au 1/10 de sang charbonneux. Les jours suivants : une petite tuméfaction à peine appréciable, c'est tout. Poids le 7 février : 570 grammes.

2° Le cobaye n° 97 (490 grammes): 1 c. c. de sérum du lapin 20 (non vacciné) avec la même dose du virus que le n° 96. Le matin du 26, nous le trouvons mort (environ 30 à 36 heures après l'inoculation).

3° le témoin n° 93 : 0,1 du virus (même dose du virus, mais sans sérum) le fait mourir dans la nuit du 24 au 25.

Nous voyons donc clairement que le sérum d'un animal vacciné, mélangé à une dose mortelle du virus, empêche l'action de celui-ci; et chose curieuse, le sérum d'un animal non vacciné retarde un peu le développement de la maladie.

Nous avons donc un moyen très simple de savoir si un sérum est actif. C'est même un moyen qui permet d'en mesurer l'activité. On n'a qu'à chercher quelle est la dose du virus qui peut être neutralisée par 1 c. c. du sérum à examiner. Nous avons, par exemple, prélevé du sang du lapin 11 que nous croyions très fortement vacciné.

Expérience. — Le 27 janvier, 0,1 c. c. d'une solution de sang charbonneux au 1/4 est ajouté à 1 c. c. de ce sérum, le tout est injecté dans la cuisse du cobaye n° 98. A la suite, nous apercevons une tumeur sensible (le 29), mais l'animal se rétablit dans les semaines suivantes, tout en restant un peu maigre.

Nous répétons cette expérience avec un témoin qui reçoit un sérum non actif.

Expérience. — Le 30 janvier, à six heures et demie du s. 1 c. c. de sérum du lapin 11 avec 0,1 c. c. d'une solution au 1/4 de virus (= 1/2 goutte de sang) est injecté au cobaye n° 106 (640 grammes). Les jours suivants, une tumeur se développe dans la cuisse (poids le 7 février : 560 grammes); mais l'animal se rétablit.

1 c. c. de sérum du lapin 26 (non vacciné), mélangé avec la même dose du virus (que pour 106), est inoculé au cobaye 108 (de 680 grammes). Le lendemain matin, on le trouve mort.

Grâce à la dose énorme du virus, on ne voit plus d'effet ralentissant du sérum non actif. Mais nous n'avons pas encore atteint la limite de ce qu'on peut ajouter de virus à 1 c. c. de sérum du lapin 11 vacciné.

Expérience. — Le 1er février, le cobaye 117 (de 780 grammes), reçoit le mélange de 1 c. c. de ce sérum et d'une goutte entière de sang charbonneux. Le 4 février : fort gonflement de la cuisse; le 7, le gonflement persiste; le 13, la tumeur diminue. Rétablissement.

Expérience. — Le 7 février, trois gouttes de sang sont ajoutées à 1 c. c. du même sérum; le tout est inoculé au cobaye 128. Une petite tumeur se forme, pas très prononcée, mais le cobaye maigrit de plus en plus, et le 17, nous le trouvons mort tout à fait cachectique. Le sérum a suffi pour préserver l'animal contre les effets du virus vivant, mais non contre ceux de la toxine.

Nous venons donc de constater que pour ce sérum, la limite est entre 1 et 3 gouttes. Pour des raisons dont nous parlerons tout à l'heure, nous ne croyions pas vaccinés les cobayes 68, 92, 96, 106. Par conséquent, nous nous en sommes servi pour définir cette limite pour le sérum du lapin 16.

Expérience. — Le 24 février, le cobaye n° 68 reçoit 1 c. c. de ce sérum avec 3 gouttes de sang charbonneux. Le matin du 27, nous le trouvons mort charbonneux.

Le cobaye n° 92 : 1 c. c. de ce sérum avec 2 gouttes de sang. Il en meurt, le 26 au matin.

Le 26 février, le cobaye n° 106 : 1 c. c. de ce sérum avec 2 gouttes de sang. Il en meurt cachectique, le 17 mars.

Le cobaye n° 96 : 1 c. c. de sérum avec 1 goutte de sang. Il a résisté. Le 26 février, 550 grammes; le 15 mars, 530 grammes.

On se rend aisément compte qu'avec un dosage soigneusement choisi, on peut avoir tous les degrés entre ces deux extrêmes : si on met trop peu de virus, l'animal n'éprouve rien du tout; si on en ajoute trop, il meurt ou bien charbonneux ou bien cachectique. On peut donc préciser un mélange par lequel on confère à l'animal une tumeur suivie de guérison. Et il était raisonnable de supposer qu'au moins ceux des animaux, qui avaient montré une tumeur non mortelle, seraient vaccinés.

Nous avions même espéré obtenir l'immunité sans tuméfaction prononcée. Mais voici ce que nous avons constaté.

Expérience. — Le 7 février, à onze heures m., le cobaye n° 70 est éprouvé avec 0,1 c. c. d'une solution du virus au 1/20. Il meurt le 8, à six heures du soir.

Le 24 février, le cobaye n° 72, éprouvé avec la même dose, meurt le 26.

Le 26, les cobayes n° 98 et n° 117 sont éprouvés avec 0,05, c. c. d'une solution au 1/20 du virus. Le matin du 28, nous les trouvons morts tous les deux.

Prévenu par ce fait, nous devions éprouver aussi ceux des cobayes qui avaient reçu le sérum séparément du virus : n°s 68, 90, 92 et qui n'avaient pas eu de tumeur appréciable. C'est pourquoi nous nous en sommes servi comme d'animaux neufs; et en réalité, comme nous venons de le dire, nous les avons vu succomber ou résister comme s'ils avaient été neufs. Restait encore le cobaye 130 (puisque malheureusement nous avions perdu le cobaye n° 99 à la suite d'une trop forte saignée); il a été éprouvé le 7 mars : il a résisté.

Encore faut-il mentionner que tous nos essais, faits en vue d'arrêter la marche de la maladie avec notre sérum, si petite que fût la tumeur, ont été infructueux, soit que notre sérum ne fut pas assez actif, soit que le cobaye fut une espèce trop fragile pour cette étude.

Des expériences qui précèdent, nous conclurons :

1° Que le sérum des lapins neufs n'a aucune action préventive, bien que ces animaux soient naturellement résistants au charbon symptomatique.

2° Que les lapins qui résistent bien, d'ordinaire, à l'inoculation du *bacterium Chauvœi*, sont cependant sensibles à l'action de la toxine de ce microbe.

3° Que le sérum des lapins qui ont été inoculés, à diverses reprises, par le *bacterium Chauvœi*, possède un pouvoir préventif quand il est injecté avant le virus.

4° Que ce sérum, mélangé même à de fortes doses de virus, empêche l'action de celui-ci.

IV

PRÉPARATION DE LA TOXINE

Comme nous l'avons mentionné, M. Roux avait déjà préparé un produit soluble du vibrion septique qui, à la dose de 40 c. c. tuait le cobaye en quelques heures, à la dose de 20 c. c. le faisait lentement mourir cachectique. Mais la substance, préparée de la même façon avec le *bacterium Chauvœi*, ne tuait plus le cobaye. Pour obtenir ces poisons, M. Roux enlevait toute la musculature à un cobaye qui venait de succomber à la maladie, il lui faisait subir l'action d'une petite presse, et il filtrait ensuite le suc exprimé sur une bougie Chamberland.

Convaincus que si les cultures faites jusqu'ici n'avaient pas donné de toxines bien actives, c'est parce qu'elles étaient faites dans des milieux trop pauvres, nous nous sommes mis à *essayer des milieux de plus en plus riches en matières albuminoïdes*. Une voie nous semblait tout indiquée par l'expérience de M. Roux, c'était de faire la culture dans le corps même d'un animal. Lorsqu'un cobaye succombe au charbon symptomatique, les microbes, que l'on trouve en abondance dans les muscles et dans la cavité péritonéale, n'ont point épuisé le milieu nutritif, et il suffirait peut-être de laisser la culture continuer, en mettant le cadavre à l'étuve, pour obtenir ensuite un suc musculaire plus riche en toxine. Malheureusement, dans ces conditions, les microbes de l'intestin envahissent bientôt le cadavre qui entre en putréfaction. Pour tourner cette difficulté, aussitôt après la mort du cobaye, en prenant toutes les précautions aseptiques, nous avons enlevé le tube intestinal compris entre deux ligatures, l'une placée sur le rectum au voisinage de l'anus et l'autre sur l'œsophage audessus de l'estomac. La cavité péritonéale était ensuite rincée à l'eau stérilisée et le cadavre placé à 37° sous une cloche stérilisée. Il est bien entendu que ce traitement ne met pas le corps du cobaye à l'abri de la putréfaction pour un temps très long, mais pour trente-six à quarante-huit heures au plus. Après ce temps, il ne répand aucune odeur de putréfaction, mais une odeur spéciale, caractéristique du développement du *bacterium Chauvœi*, odeur aigrelette et butyrique à la fois. Le suc musculaire, ensemencé dans du bouillon

au contact de l'air, ne donne pas de culture, ce qui prouve l'absence de microbes autres que les anaérobies.

En passant à la presse les muscles, découpés en morceaux, de ce cadavre où s'est fait une culture prolongée du charbon symptomatique, nous avons obtenu un suc musculaire que nous avons débarassé des microbes par une filtration sur une bougie Chamberland. Nous dirons tout de suite que, dans toutes nos expériences sur la préparation de la toxine, nous avons stérilisé nos liquides par filtration et non par la chaleur, qui altère la substance active.

Le liquide, ainsi obtenu, tue un cobaye (n° 74, poids 550 grammes), en trente heures, à la dose de 15 c. c. injectés dans le péritoine. Un autre cobaye (n° 75, 620 grammes), qui en reçoit 10 c. c., est malade et se rétablit; éprouvé, six jours après, avec une dose mortelle, ordinaire, du virus, il a une tumeur charbonneuse qui s'abcède et s'ouvre douze jours plus tard, mais il reste bien portant.

Cet essai nous ayant confirmé dans l'opinion qu'il suffit de faire la culture du charbon symptomatique dans des milieux riches en matières albuminoïdes pour avoir des toxines actives, nous avons tâché de réaliser ces conditions artificiellement et d'une manière plus simple.

Le *bacterium Chauvœi* étant anaérobie, les cultures doivent être faites à l'abri de l'air. Pour réaliser rigoureusement cette vie sans air, nous avons eu recours à la technique employée à l'Institut Pasteur et qui consiste à faire le vide dans les vases de culture au moyen d'une trompe à eau, puis à y laisser rentrer, à diverses reprises, de l'hydrogène pour enlever les dernières traces d'air. Au moyen d'un dispositif très simple, il est facile d'obtenir des cultures anaérobies dans des vases de grande capacité et avec une sécurité parfaite. Les vases de culture sont fermés au chalumeau, soit quand il sont vides, soit sous une pression d'hydrogène quelconque, mais inférieure à la pression atmosphérique. Notre microbe dégageant des gaz, nous fermons sur le vide. Lorsque le développement se fait bien, le dégagement gazeux est abondant, la pression développée est assez forte pour avoir amené une fois l'éclatement d'un de nos ballons. Cette augmentation de pression est un signe de réussite de la culture; quand elle n'existe pas, il ne s'est pas formé de toxine en quantité appréciable.

Les milieux nutritifs qui nous ont servi sont d'abord la macération de viande stérilisée au filtre Chamberland, puis le sérum de bœuf additionné de deux fois son volume d'eau distillée. Ce sérum ainsi étendu peut être chauffé à 115° à l'autoclave sans se coaguler, il louchit légèrement; il est donc facile à préparer et M. Roux l'avait employé autrefois pour cultiver le vibrion septique. Dans ce liquide albumineux, le *bacterium Chauvæi* détermine bientôt une coagulation ; en même temps la réaction devient acide. Cette formation d'acide a déjà été signalée par M. Kitasato; pour l'éviter, nous avons ajouté du carbonate de chaux, mais alors le développement des microbes est arrêté. Dans ce sérum additionné d'eau, il ne se forme pas assez de toxine pour l'étude. La culture dans du sang fraîchement extrait du cœur nous a donné un filtrat qui, à la dose de 18 c. c., a tué le cobaye 63 en six semaines.

Nous avons mieux réussi en faisant nos cultures dans de la viande. Tout d'abord, pour imiter ce qui se passe quand on inocule un animal dans les muscles, nous avons essayé d'ensemencer les microbes au centre d'un épais morceau de viande fraîche, stérilisé à la surface et mis à l'étuve. Dans la profondeur du tissu les conditions de la vie anaérobie se trouvaient réalisées. Pour stériliser la surface du morceau de viande, nous avons eu recours au rôtissage superficiel à la flamme du gaz, à l'action de l'eau bouillante : mais tous ces procédés n'ont pas empêché des microbes d'impureté (notamment le *bacillus subtilis*) de se développer sur les morceaux de viande. Nous avons donc renoncé à ce procédé à cause de sa technique trop incertaine et nous nous sommes contenté de viande fraîche hachée, introduite dans des ballons à long col, à raison de 100 à 150 gr. par ballon de 400 c. c. environ, de façon à laisser les trois quarts du volume pour le développement des gaz. Dans chaque ballon, on ajoute 2 c. c. d'une solution de soude à 10 °/₀, au moyen d'un entonnoir à longue douille, sans en mettre sur les parois du col. Les ballons ainsi préparés sont obturés par un tampon d'ouate, recouverts d'un cornet de papier, et stérilisés à 120° à l'autoclave pendant quinze à vingt minutes.

Après le refroidissement, on fait l'ensemencement en mettant une goutte de sang charbonneux dans chaque ballon, au moyen d'une longue pipette. Puis on enfonce l'ouate au moyen d'une

tige de verre flambée, assez avant dans le col, sur lequel on fait deux étranglements, entre lesquels se trouve la bourre de coton. Enfin, on fait le vide avec la trompe à eau, en laissant rentrer trois à quatre fois l'hydrogène dépourvu d'oxygène, et on ferme le ballon avec un petit chalumeau à main.

Après un séjour de 24 heures à la température de 37°, il y a déjà un changement visible produit par la culture. Toute la masse est devenue d'une couleur rouge brique (cette couleur disparaît immédiatement au contact de l'air). Cette coloration est un indice de la pureté de la culture. Celle-ci continuant à se développer, la viande qui s'était agglomérée à l'autoclave ne tarde pas à se désagréger, et, au bout de 10 jours, elle est convertie en un liquide avec un fort dépôt grumeleux. Ce liquide est extrêmement riche en microbes (qui se colorent bien d'après le procédé de Gram) et en spores (qui restent incolores). Une gouttelette ensemencée dans du bouillon ne doit pas donner de culture au contact de l'air. Les gaz, dégagés par les microbes, exercent une forte pression. Si on ramollit la pointe effilée du ballon dans un bec Bunsen, il se produit une soufflure et les gaz s'échappent et s'enflamment. Pour obtenir le plus possible de substance active, nous avons d'abord décanté la partie liquide. Le dépôt, recueilli dans un linge, fut soumis à la presse pour exprimer le liquide qu'il contenait. Le tout réuni est filtré d'abord sur du papier Chardin et enfin sur un filtre Chamberland.

A quel moment faut-il mettre un terme à la culture pour avoir le plus de toxine? Car il est très possible qu'après avoir élaboré leur poison, les microbes, continuant à vivre, le détruisent ou le transforment en partie.

Pour répondre à cette question, nous avons mis en train une série de cultures en ballons, que nous avons ouverts à différents intervalles. Le liquide d'un premier ballon, ouvert après 7 jours, a donné les résulats suivants :

10 c. c. ont tué le cobaye 103 (de 600 grammes), en 12 heures.

5 c. c. ont tué le cobaye 104 (de 580 grammes), en 30 heures.

3 c. c. ont rendu malade le cobaye 111 (de 780 grammes), qui a survécu.

4 c. c. ont fait mourir le cobaye 123 (de 450 grammes), en 10 jours.

5 c. c. ont tué le cobaye 115 (de 750 grammes), en moins de 15 heures.

La dose mortelle pour le cobaye est donc de 4 à 5 c. c.

Un deuxième ballon, ouvert après 9 jours, a fourni un liquide dont voici l'action :

5 c. c. injectés au cobaye 112 (de 820 grammes) l'ont rendu malade : un mois après, 1 c. c. l'a tué au bout de 24 heures.

5 c. c. ont rendu le cobaye 116 (de 750 grammes) très malade, mais ne l'ont pas tué, l'épreuve a été faite le 1er février ; le 26 et le 28, le même cobaye reçoit 1 c. c. et le 5 mars 0,5 c. c. ; il en meurt cachectique le 17 mars.

6 c. c. ont tué le cobaye 124 (de 340 grammes), en 48 heures.

Ce ballon a donc donné un produit moins actif que le premier.

Un troisième ballon fut ouvert le 11e jour.

5 c. c. du liquide tuent le cobaye 124 (de 740 grammes), en 14 jours.

6 c. c. tuent le cobaye 125 (de 420 grammes), en 5 jours.

Ce ballon est également moins actif que le premier.

Pour le quatrième, âgé de 13 jours :

5 c. c. ont tué le cobaye 127 (de 340 grammes), en 5 jours.

Pour le cinquième, âgé de 15 jours :

5 c. c. n'ont pas tué le cobaye 1 de (de 600 grammes), mais l'ont rendu malade pendant 15 jours.

Ces résultats ne sont pas d'une régularité mathématique, ce qui n'est pas surprenant, puisque nous éprouvons la toxicité de nos cultures au moyen d'animaux de résistance variable, mais ils prouvent que, vers le septième jour, la culture a donné le maximum de toxine. D'ailleurs, en jugeant d'après l'aspect, il nous a semblé que, dès le dixième jour, la culture était arrêtée. Un autre essai, dans lequel les ballons ont été ouverts dès le deuxième jour, a montré que la toxicité maxima se rencontre dans les cultures âgées de 6 à 8 jours [1].

1. Culture de 2 jours. — 5 c. c. de liquide filtré, injecté au cobaye n° 129, poids 527 grammes, sont sans effet.

Culture de 3 jours. — 5 c. c. ne tuent point un cobaye de 640 grammes, n° 131.

Culture de 4 jours. — 5 c. c. tuent le cobaye n° 132, poids 600 grammes, en 24 heures.

Culture de 5 jours. — 5 c. c. provoquent un amaigrissement considérable chez le cobaye 134, mais ne le tuent pas. 5 c. c. tuent le cobaye 142, poids 620 grammes, en 30 heures.

Culture de 6 jours. — 5 c. c. tuent le cobaye, n° 140, du poids considérable de 830 grammes, en 20 heures.

Mentionnons encore qu'un ballon témoin non ensemencé, traité de la même façon, nous a donné un liquide tout à fait inoffensif, à la dose de 10 c. c. pour un cobaye de 450 grammes (n° 120). Cet animal, éprouvé 4 jours après avec 0,1 c. c. du virus (au 1/20), est mort du charbon symptomatique en 15 heures.

Lorsqu'on ne dispose pas d'une trompe à eau ou d'une pompe pour faire le vide, on peut procéder comme il suit :

Un flacon (d'un litre) est rempli d'un kilogramme de purée de viande, additionnée de 15 c. c. d'une solution de soude à 10/0, et fermé avec un bouchon de caoutchouc à deux trous qui laissent passer deux tubes de verre ; l'un, qui descend jusqu'au fond du vase, est courbé en dehors à angle droit, et porte dans sa partie horizontale deux étranglements entre lesquels se trouve une bourre d'ouate. L'autre, qui est destiné à laisser échapper les gaz, s'arrête dans le col du flacon et est obturé, extérieurement, par un petit bouchon de coton protégé par un cornet de papier. Le tout est stérilisé à l'autoclave à 120° ; quand la température s'est abaissée à 100° et qu'il n'y a donc pas trace d'air dans la viande, on enlève le flacon ; on le met, aussi rapidement que possible, en communication avec l'appareil à courant d'hydrogène, pour empêcher la dissolution de l'air dans la masse de la viande, et on laisse passer l'hydrogène jusqu'au complet refroidissement. On ensemence alors avec une petite pipette par le petit tube droit, tout en laissant aller le courant d'hydrogène. Après cela, on enfonce le bouchon d'ouate et l'on ferme le petit tube de dégagement avec un bouchon de caoutchouc. L'autre tubulure est fermée au chalumeau, au point de l'étranglement. Ceci fait, le flacon est mis à l'étuve. Quand les gaz commencent à se dégager, on retire le bouchon de caoutchouc, et la culture reste anaérobie, grâce à cette production gazeuse. Il nous semble que ce procédé est moins rigoureux que le précédent, car les cultures ainsi faites n'étaient pas aussi abondantes que dans les ballons. Mais il suffit cependant à produire une toxine suffisamment active pour l'étude.

Un liquide qui tue à la dose de 5 c. c. n'est pas encore bien maniable pour des expériences sur les animaux. Il fallait donc le condenser. Puisqu'il est impossible d'avoir recours à la chaleur, nous n'avons à notre disposition que la condensation

dans le vide sur l'acide sulfurique. L'opération est faite à la température de 32°, de sorte qu'en 60 heures, 210 grammes de liquide sont réduits à 65 grammes, c'est-à-dire au tiers environ. Ce liquide concentré laisse déposer des cristaux qui augmentent beaucoup, si on a soin de le laisser au froid pendant 24 heures, au sortir de l'exsiccateur. Ces cristaux sont formés par du phosphate ammoniaco-magnésien, et il est facile de les séparer par filtration sur papier épais. Il va sans dire que toutes les manipulations sont faites avec pureté, que les vases, les filtres employés sont stérilisés; avec ces précautions, on réussit à obtenir une toxine concentrée qui se conserve sans altération.

C'est une substance évidemment très complexe, qui se présente sous l'aspect d'un liquide clair, de couleur brun foncé (à peu près semblable à la tuberculine) et qui répand une odeur prononcée d'acide butyrique. La réaction est légèrement acide.

Ce liquide nous a servi aux expériences suivantes :

Expérience. — Le 18 février, 1,5 c. c. a tué le cobaye 145 (de 440 gr.), en 5 jours.

Le 18 février : 1,0 c. c. a rendu malade le cobaye 147 (de 450 gr.), pour trois semaines. Le 19 mars, il était encore très maigre.

Le 18 : 0,5 c. c. n'a donné qu'un malaise passager au cobaye 146 (de 700 gr.). Trois jours après, ce cobaye, bien portant en apparence, fut éprouvé avec 0,1 c. c. du virus au 1/20. Il mourut 30 heures après.

Le 20 février, 2,5 c. c. sont injectés au cobaye 155 (de 570 gr.). Il en meurt en 22 heures.

Le 21 février, 2,0 c. c. ont donné la mort au cobaye 156 (de 500 gr.), en 21 heures.

Nous pouvons donc regarder comme établi : 1° que la dose de 1,5 c. c. est mortelle; 2° que la dose de 2 c. c. tue rapidement le cobaye. Ces données nous ont servi de base pour les expériences ultérieures.

V

ACTION DU SÉRUM DES ANIMAUX IMMUNISÉS SUR LA TOXINE DU CHARBON SYMPTOMATIQUE

Maintenant que nous sommes munis d'une toxine active à petite dose, il est facile de savoir si le sérum des lapins immunisés, qui est doué d'un pouvoir préventif, a aussi une propriété

antitoxique. Pour cela, il suffit de mélanger *in vitro* le sérum avec une dose mortelle de toxine et d'injecter le mélange dans le péritoine de cobayes.

Expérience. — Le 21 février, le cobaye n° 157, du poids de 550 grammes, reçoit dans le péritoine 2,5 c.c. de toxine concentrée, mélangée à 2,5 c.c. de sérum du lapin immunisé n° 16. Ce cobaye résiste, tandis que le cobaye témoin 156, du poids de 500 gr., meurt en 24 heures, après avoir reçu 2,0 c.c. de la même toxine.

Expérience. — Le 23 février, nous injectons dans le péritoine d'un cobaye 161, poids 470 grammes, 3 c. c. de toxine (dose deux fois mortelle) mélangés à 2 c. c. de sérum du lapin 16. Ce cobaye résiste.

Le 24 février, le cobaye 162 reçoit de même, dans le péritoine, 3 c. c. de toxine et 1,5 c. c. seulement de sérum du lapin 11. Il résiste également.

Pour bien montrer que le sérum des lapins immunisés n'agit pas en diluant la toxine, nous avons fait la contre-épreuve avec du sérum de lapin non vacciné.

Expérience. — Le 24 février, le cobaye n° 163, poids 670 grammes. reçoit le mélange de 3 c. c. de toxine et de 2 c. c. de sérum du lapin 11, vacciné. Il résiste, tandis que le cobaye 164, du poids de 670 grammes, meurt en moins de 15 heures, après avoir reçu seulement 2,5 c. c. de toxine mélangés à 2,5 c. c. de sérum d'un lapin neuf.

On peut, d'ailleurs, augmenter encore la dose de toxine par rapport à celle du sérum, et constater encore un effet antitoxique. C'est ainsi qu'un cobaye, auquel on injecte un mélange de 4 c. c. de toxine et de 1 c. c. de sérum du lapin 16, maigrit, mais ne meurt que 8 jours plus tard en état de cachexie.

Le sérum antitoxique manifeste-t-il encore ses effets lorsqu'on l'injecte, non plus mélangé à la toxine, mais dans un point du corps éloigné de celui où on introduit le poison?

Et d'abord, la quantité de toxine qui tue, lorsqu'elle est introduite dans le péritoine, est-elle encore mortelle lorsqu'on l'injecte sous la peau?

Expérience. — Le 23 février, le cobaye n° 160, du poids de 550 grammes, reçoit sous la peau du ventre 2 c. c. de toxine. Après quelques heures, un œdème de 4 centimètres de long sur 2 de large se développe au point d'injection; de la sérosité sort par le trajet de l'aiguille; la peau est macérée, puis se nécrose les jours suivants, mais l'animal ne meurt pas.

L'action nécrosante de la toxine du charbon symptomatique, lorsqu'elle est introduite sous la peau, est donc très énergique

et est comparable à celle qu'exercent d'autres poisons microbiens, le poison diphtérique, par exemple. Si, dans l'expérience précédente, l'animal n'a pas succombé, c'est que la majeure partie de la toxine injectée n'a pas été absorbée à cause de la rapidité et de la violence du processus local. Il n'en est plus de même, si on fait l'injection en plusieurs piqûres et à divers endroits du corps.

Expérience. — Le 24 février, 2 c. c. de toxine sont injectés à un cobaye de 450 grammes (n° 166), en quatre piqûres, par portions de 0,5 c. c. Deux sont faites dans les muscles des cuisses, deux sous la peau du ventre, à distance l'une de l'autre. Le 25 au matin, l'animal est trouvé mort.

L'injection préalable du sérum de lapin immunisé préserve les animaux contre les effets de la toxine injectée sous la peau.

Expérience. — Le 25 février, le cobaye n° 165, du poids de 580 grammes, reçoit 2,5 c. c. de toxine sous la peau, en quatre piqûres éloignées les unes des autres. Une heure auparavant, on lui avait injecté dans le péritoine 2 c. c. du sérum du lapin immunisé n° 11. Ce cobaye a résisté.

Un cobaye témoin n° 11, de 540 grammes, reçoit d'abord dans la cavité abdominale 2,5 c c. de sérum d'un lapin non immunisé, puis une heure après, 2,0 c. c. de toxine sous la peau en quatre piqûres; il meurt le 27 février.

Tous ces animaux, traités avec le sérum et qui ont survécu, ont été plus ou moins malades. Le mélange de sérum et de toxine est loin d'être inoffensif, aussi ne croyons-nous point que le sérum et la toxine agissent l'un sur l'autre en se neutralisant mutuellement. Tout ce que l'on peut dire, c'est que le sérum, injecté à un animal, suspend ou amoindrit les effets délétères de la toxine, comme si le sérum avait sur l'organisme de l'animal ou du moins sur une partie de ses cellules une action opposée à celle de la toxine.

Dans le liquide parfaitement limpide que nous avons appelé toxine, il y a, cela nous paraît évident, outre la substance nocive spécifique, encore quantité d'autres substances solubles qui, tout en étant toxiques elles-mêmes, n'ont rien à faire avec le corps dont les effets délétères sur l'organisme sont suspendus par le sérum. Il doit notamment y avoir une grande quantité de sels provenant de la viande décomposée, et desquels il faut tâcher de se débarrasser.

Il serait très utile d'isoler le poison du charbon symptoma-

tique de toutes ces impuretés qui l'accompagnent. Pour des raisons purement extérieures au sujet, nous n'avons pas pu pousser plus loin cette partie de notre étude. Cependant, les quelques expériences que nous avons faites, pour nous orienter dans cette voie, ne laissent pas de présenter quelque intérêt.

Le premier procédé de purification que nous ayons essayé, c'est la précipitation par une grande quantité d'alcool. 25 c. c. d'une substance, qui tue le cobaye à la dose de 3 c. c., ont été précipités par 250 à 300 c. c. d'alcool à 96°. Nous avons laissé déposer le précipité, puis décanté l'alcool. Le précipité fut complètement desséché dans le vide, puis dissous dans 16 c. c. d'eau distillée stérilisée et filtré sur un filtre stérilisé; 2 c. c. de ce liquide ont donné la mort au cobaye 175 (de 850 grammes en 5 jours. Ce liquide est donc à peu près aussi toxique que la substance originelle. Pour examiner la portion dissoute dans l'alcool, nous avons évaporé celui-ci dans le vide; et le résidu fut dissous dans 12 c. c. d'eau et filtré. 2,5 c. c. ont tué le cobaye 182 (de 570 grammes) en 1/2 heure, par injection intrapéritonéale; il est mort comme foudroyé. Une dernière portion de 20 c. c. de toxine, dont 3 c. c. ont tué le cobaye 174 (de 550 grammes) en 30 heures, fut traité par la *dialyse* pendant une nuit. Ce qui restait dans le dialyseur fut évaporé dans le vide. La substance sèche fut dissoute dans 6 c. c. d'eau stérilisée. *Cette solution filtrée* a tué le cobaye 183 (de 480 grammes) en moins de 15 heures, à la dose de 2 c. c.

La substance soluble dans l'alcool et celle qui y est insoluble sont toutes deux toxiques. Si nous avions eu le loisir de les préparer en plus grande quantité, nous aurions essayé sur chacune d'elles l'action du sérum préventif et du sérum de lapin non immunisé. Il nous paraît peu probable que le sérum actif contrebalance en même temps les deux substances que nous avons séparées. C'est là un point intéressant dont nous reprendrons l'étude.

VI

ACTION DE LA TOXINE DU CHARBON SYMPTOMATIQUE SUR LES COBAYES

Quelle est la nature de cette toxine du charbon symptomatique qui, suivant la dose, tue un cobaye en 2 heures, 3 jours, 10 jours, un mois et même davantage? Nous ne sommes pas assez avancés

pour répondre à cette question. Tout ce que nous pouvons dire, c'est que, lorsqu'on l'injecte à dose mortelle dans le péritoine d'un cobaye, celui-ci présente bien des symptômes que l'on observe chez un animal inoculé avec le *bacterium Chauvœi*. Il cesse de manger, est triste, a les poils hérissés, vacille sur ses jambes, est agité de brusques mouvements convulsifs, surtout quand on le touche, et présente une hypothermie qui va croissant jusqu'à la mort. A l'autopsie, on trouve un peu de liquide dans la péritoine; point de microbes, ni dans les sérosités, ni dans le sang, ni dans les organes. On ne remarque aucune lésion apparente du foie, de la rate ou du rein. L'aspect des organes ne présente non plus rien de caractérisé à l'œil nu, lorsque la mort survient au bout d'un mois, à la suite de la cachexie. Comme l'amaigrissement est extrême, ils paraissent simplement réduits de volume. Y a-t-il une action sur le système nerveux? Sur quelles parties du corps agit le poison pour amener ainsi une consomption fatale, comme on en observe chez les animaux inoculés par certains virus? Sans pouvoir répondre à toutes ces questions, nous dirons que les cellules, qui constituent les moyens ordinaires de défense de l'organisme, nous semblent atteintes. En effet, tous les animaux qui ont reçu des doses de toxine un peu inférieures à la dose mortelle, restent pendant assez longtemps particulièrement sensibles au virus vivant du charbon symptomatique. Pendant les jours qui suivent immédiatement l'administration du poison, leur sensibilité à l'inoculation est exagérée, ainsi que cela a été déjà observé par M. Roger. C'est ce qui nous fait dire que la toxine a paralysé ou affaibli les phagocytes.

Nous supposions, avec M. Roger, que cet effet prédisposant immédiat de la toxine ferait place à un état vaccinal consécutif. Après avoir attendu que les animaux aient recouvré leur ancien poids, nous les avons éprouvés avec du virus vivant, à des temps variables après l'injection de la toxine.

Voici les résultats que nous avons obtenus, l'inoculation d'épreuve étant toujours faite avec 0,1 c. c. de sang charbonneux dilué au 1/20.

Expérience. — Le 18 février, le cobaye n° 146 reçoit 0,5 c. c. de toxine (1/3 de la dose mortelle). Éprouvé le 21 (=3 jours après). Meurt en 34 heures.

Le 31 janvier, le cobaye 111 reçoit 3 c. c. (4 c. c. en ont tué en 10 jours). Éprouvé le 7 février (= 7 jours après). Meurt en 18 heures.

Le 14 janvier, le cobaye n° 65 reçoit 5 c. c. (12 c. c. ont tué rapidement). Éprouvé le 23 (= 9 jours plus tard). Le matin du 25, trouvé mort.

Le 7 janvier, le cobaye n° 39 : 12 c. c. d'une toxine (dont 18 c. c. ont tué en 3 semaines). Eprouvé le 19 (= 12 jours après). Meurt 36 heures après.

Le 8 février, le cobaye n° 1 : 5 c. c. de toxine (dont la dose mortelle est entre 6-7 c. c.). Éprouvé le 6 mars. Le 8 au matin, trouvé mort.

Nous avons essayé aussi de toutes petites doses répétées.

Expérience. — Le 12 février, le cobaye 134 (600 grammes) reçoit 5 c. c. de toxine (la même dose avait tué n° 127 en 5 jours). Il se rétablit en 3 semaines. Alors il reçoit de la même toxine : le 1er mars, 1 c. c.; le 3, 0,5 c. c.; le 4, 1 c. c.; le 5 0,5 c. c. Pendant ce temps le poids monte de 550 grammes à 580 grammes. Le 7 au soir, il est éprouvé. Il meurt le 8, en 30 heures.

Expérience. — Le 10 février, le cobaye 131 (de 640 grammes) reçoit 5 c. c. de toxine (dose mortelle entre 6-7 c. c.). Il maigrit, se reprend lentement, et paraît bien portant le 28. Il reçoit alors : le 28 février, le 3 mars, le 5, le 12 : 0,5 c. c. de la même toxine. Éprouvé le 15 mars, il succombe 36 heures après.

Ces résultats absolument négatifs nous ont véritablement surpris, surtout ceux des deux dernières expériences. Peut-être que des animaux, éprouvés beaucoup plus longtemps après l'administration de la toxine, auraient résisté. Peut-être que pour vacciner, il faudrait donner des doses inférieures au 1/10 de la dose mortelle? Tout ce que nous pouvons dire, c'est que la toxine, tirée des milieux artificiels et non altérée, nous semble un mauvais moyen de vaccination. Non seulement les animaux ainsi traités ne sont pas réfractaires au virus vivant, ils sont encore plus sensibles à l'action de la toxine elle-même.

Expérience. — Le 1er février, le cobaye 116 reçoit 5 c. c. de toxine (dont 6 c. c. ont tué en 2 jours). Il maigrit. Le 26 février, apparemment bien portant, il reçoit 1 c. c. de toxine (de la même toxicité); le 28, même injection; le 5 mars : 0,5 c. c. Il commence à maigrir de nouveau et meurt le 17, tout à fait cachectique

Le 31 janvier, le cobaye 112 : 3 c. c. de la même toxine que le cobaye précédent. Il perd plus d'un quart du poids dans les trois semaines suivantes. Il semble se rétablir un peu; reçoit le 26 février, 1 c. c. de la même toxine qui le fait mourir en 36 heures.

Ces animaux périssent avec des doses de toxine tout à fait inoffensives pour des animaux neufs, ce qui doit être rapproché du fait que les animaux traités de même avec la toxine n'étaient

pas vaccinés contre le virus vivant. Cette substance semble donc déterminer des lésions dont l'organisme se débarrasse difficilement et contre lesquelles il paraît mal armé.

VII

VACCINATION DES ANIMAUX CONTRE LE CHARBON SYMPTOMATIQUE

Nous avons, par une autre voie, obtenu des résultats positifs qui confirment ceux déjà publiés par M. Roux. Ce savant a d'abord vacciné avec des cultures stérilisées à 115°, procédé dont nous ne nous occuperons pas ici, car il fait usage d'une substance qui a subi de fortes altérations par la chaleur. Ce procédé est analogue à ceux qu'on emploie pour donner l'immunité contre la diphtérie et le tétanos au moyen de toxine chauffée. Ce qui nous intéresse ici, ce sont les expériences dans lesquelles M. Roux a conféré l'immunité avec la sérosité filtrée d'un cobaye ayant succombé au charbon symptomatique[1]. Comme nous l'avons décrit plus haut, nous avons renforcé la toxicité de cette sérosité, en laissant pendant quelque temps le cadavre du cobaye à l'étuve. Le liquide, filtré sur le filtre Chamberland, a tué à la dose de 18 c. c. Avec ce liquide, nous avons fait les expériences suivantes :

Expérience. — Le 17 janvier, le cobaye 75 (de 650 grammes) reçoit 10 c. c. dans le péritoine. Il devient malade, mais se rétablit bien vite. Nous l'éprouvons le 23. Le gonflement consécutif à l'inoculation aboutit à un abcès qui s'est ouvert 12 jours plus tard.

Le 20 janvier, nous avons injecté en même temps la sérosité aux cobayes suivants :

Cobaye 80 : 2 c. c. Eprouvé 3 jours après, il résiste, avec un abcès consécutif. Néanmoins le 28 février, la dose mortelle de toxine concentrée de 1,5 c. c. l'a tué en 4 jours.

Cobaye 83 : 4 c. c. 3 jours après nous l'éprouvons. Il a une forte tumeur aboutissant à un abcès que nous trouvons ouvert le 3 février. Le 9 février nous prélevons du sang dans la carotide, ce qui le fait mourir le 12, avec un charbon symptomatique typique. C'était évidemment la plaie du cou qui était le point de départ de l'œdème charbonneux.

Cobaye 79 : 2 c. c. Éprouvé 6 jours après il succombe en 24 heures.

1. Nous mentionnerons pour mémoire que nous avons réussi à vacciner des cobayes en leur injectant une très petite quantité de virus dans le tissu dur de l'extrémité d'une patte postérieure, à l'imitation du procédé de MM. Arloing, Cornevin et Thomas, qui consiste à inoculer les vaccins au bout de la queue.

Cobaye 84 : 4 c. c. Éprouvé le 28, il meurt rapidement (en 15 heures).

Cobaye 81 : 2 c. c. Cette dose est répétée le 25. Éprouvé le 27, il a une tumeur, mais résiste et est vacciné. Un mois plus tard, nous l'éprouvons : abcès avec fistule.

Le cobaye 83 nous fournit un exemple de ce fait que M. Metchnikoff a signalé dans son étude sur le hog-choléra, à savoir que, chez un animal immunisé, on peut trouver des microbes virulents dans un abcès datant de dix-sept jours.

« Cette longue résistance des bactéries englobées, dit M. Metchnikoff, fait comprendre que, dans quelques circonstances défavorables pour l'organisme du lapin, le microbe parvienne à se développer et à tuer son hôte. » Dans notre cas la circonstance défavorable, c'est la saignée que nous avons fait subir au cobaye.

Dans la même étude, M. Metchnikoff a constaté que les animaux, vaccinés contre le hog-choléra, sont au moins aussi sensibles à la toxine élaborée par ce microbe que les animaux non vaccinés ; ils succombent même quelquefois à des doses qui ne tuent pas les animaux neufs. La mort du cobaye 80 confirme qu'il en est de même pour le charbon symptomatique.

Nous devons maintenant revenir à l'effet vaccinant du suc musculaire d'un cobaye mort de charbon symptomatique. C'est avec intention que nous avons surtout étudié l'effet d'une dose unique. C'est un procédé plus incertain que celui des doses répétées de M. Roux. Et l'effet en est d'autant plus passager que la dose est plus petite. Mais enfin, nous avons eu des résultats positifs, aussi bien avec de grandes qu'avec de petites doses, tandis qu'avec la toxine obtenue par nos cultures sur viande, nous n'avons pas pu obtenir de vaccination, quelle que soit la façon dont nous l'ayons administrée. Comment expliquer cette contradiction ? De la manière suivante, à notre avis.

Il a été bien établi, par différents observateurs, que les animaux qui succombent à certaines maladies, au choléra inoculé dans le péritoine, par exemple, n'en donnent pas moins un sérum préventif. Nous avons constaté, nous-même, que des lapins (nos 15 et 23), en train de mourir du charbon symptomatique, ont donné un sérum préventif contre cette maladie. Enfin, on sait bien que les cultures du pneumocoque (Talamon-Frænkel) dans du sérum préventif contre la maladie, sont inoffensives

pour le lapin à des doses absolument mortelles sur d'autres milieux. On a même voulu en conclure que les microbes étaient atténués par le sérum; mais c'est à tort. Comme M. Issaeff l'a démontré, il suffit de séparer les microbes du sérum et de les injecter séparément pour prouver qu'ils sont des plus virulents, et que ces cultures ne sont inoffensives que parce qu'on injecte, avec les microbes, le sérum préventif dans lequel ils ont poussé.

Eh bien, il nous paraît qu'on fait précisément quelque chose de semblable en injectant le produit de filtration du suc musculaire d'un animal mort de charbon symptomatique. On injecte la substance préventive, déjà élaborée par l'organisme avant la mort, en même temps que la toxine préparée par le microbe. Et c'est par celle-là qu'on immunise, non pas par celle-ci.

Nous nous hâtons d'ajouter que nous ne croyons nullement impossible de transformer notre toxine en une substance vaccinante, soit par la chaleur, soit par le mélange avec un corps chimique, soit enfin en séparant ce que nous appelons toxine en une partie toxique et une partie vaccinante. Ce sont là des points que nous devons encore étudier. Mais, jusqu'à réfutation par l'expérience, nous croyons que la toxine non altérée se prête aussi difficilement à la vaccination que les toxines diphthérique et tétanique non altérées.

Certains auteurs croient, nous ne l'ignorons pas, que la substance préventive (ou antitoxique si on préfère ce mot) dérive de la toxine microbienne modifiée par les cellules du corps animal. Nous ne discuterons pas le bien-fondé de cette hypothèse. Il nous suffit de constater qu'elle ne contredit pas notre interprétation.

De ce qui précède, nous tirerons les conclusions suivantes :

1° La toxine du charbon symptomatique, retirée des cultures sur viandes et non altérée, ne vaccine pas contre le virus vivant. Les cobayes qui la reçoivent paraissent au contraire plus sensibles à l'action de ce virus;

2° Les cobayes qui ont reçu de la toxine sont pendant longtemps moins résistants à l'action de cette toxine que les cobayes neufs;

3° La sérosité filtrée des animaux qui ont succombé au charbon symptomatique est vaccinante, non parce qu'elle contient de la toxine, mais parce qu'elle renferme la substance

préventive qui existe dans les humeurs des animaux immunisés;

4° Le *bacterium Chauvœi* peut persister longtemps, vivant et virulent, dans le corps des animaux vaccinés;

5° Des lapins qui succombent à l'inoculation de ce microbe peuvent fournir un sérum préventif;

6° Des animaux immunisés contre le virus vivant peuvent donner un sérum qui manifeste des propriétés antitoxiques *in vitro* et dans le corps d'un autre animal.

VIII

RELATIONS ENTRE LE CHARBON SYMPTOMATIQUE ET LA SEPTICÉMIE AIGUE

La substance qui nous a servi de source de virus dans nos expériences sur le charbon symptomatique était la poudre vaccinante de M. Arloing. Nos expériences nous ont montré que, d'ordinaire, elle ne donne pas de tumeur charbonneuse au lapin. Il est donc bien légitime de la regarder comme du véritable charbon symptomatique.

Notre vibrion septique est le virus qui, depuis des années, sert aux expériences de démonstration faites à l'Institut Pasteur pour le cours de bactériologie. Après deux passages par le cobaye, ce virus nous a servi à inoculer deux lapins très forts. Tous les deux en sont morts avec un œdème gazeux typique. Nous ajoutons qu'en dehors de cette différence d'action sur les animaux, il est très difficile de distinguer les deux microbes, soit au microscope, soit dans les cultures, soit par la marche de la maladie chez le cobaye. Il nous a paru seulement que, chez cet animal, notre charbon symptomatique évoluait encore plus vite que l'œdème malin : cela peut tenir au grand nombre de passages sur des animaux que le virus avait subi dans le courant de notre travail.

Pour savoir si les animaux immunisés contre le charbon symptomatique le sont aussi contre l'œdème malin, nous avions réservé un certain nombre d'animaux vaccinés au cours des expériences rapportées plus haut. Avant toute chose, nous les avons encore soumis à une inoculation d'épreuve avec une dose mortelle de *bacterium Chauvœi*. Quatre cobayes, qui l'ont bien supportée, sont inoculés dans les huit ou quinze jours qui suivent avec du vibrion septique qui tue les témoins en quinze heures;

tous résistent. De même deux lapins, n° 31 et n° 10, qui ont eu plusieurs abcès charbonneux et qui sont rétablis, reçoivent l'un une 1/2 goutte, et l'autre une goutte entière de virus septique; ils restent bien portants[1], tandis que le lapin témoin est tué par une demi-goutte du même virus.

Il est donc hors de doute que des cobayes et des lapins immunisés contre le charbon symptomatique le sont aussi contre l'œdème malin. Si M. Kitasato n'a pas pu vérifier ce fait, déjà annoncé par M. Roux, c'est peut-être qu'il s'est servi d'une espèce de vibrion autre que celle de l'Institut Pasteur, employée par nous.

Non-seulement le *bacterium Chauvœi* immunise contre le vibrion de l'œdème malin, mais le sérum des animaux réfractaires au charbon symptomatique mélangé au virus septique empêche son effet :

Expérience. — Le 19 février, le cobaye n° 151, poids 580 grammes, reçoit le mélange de 1 c. c. du sérum du lapin n° 16 (vacciné contre le charbon symptomatique) avec 0,1 c. c. d'une dilution de sang septique au 1/20. Il reste tout à fait bien portant. Nous répétons l'expérience avec un témoin pour avoir toute sûreté.

Le 22 février, le cobaye 158 (de 500 grammes) reçoit 0.1 c. c. d'une solution au 1/20 de sang septique. Il meurt en 18 heures.

Le cobaye n° 159 (de 530 grammes) reçoit la même dose du virus avec 1 c. c. de sérum du lapin 16. Il a un petit gonflement de la cuisse qui disparaît après quelques jours.

Nos expériences avaient démontré que 1 c. c. de sérum du lapin 16 peut contrebalancer les effets d'une goutte entière de sang charbonneux. Nous avons alors essayé la même dose de sang septique.

Expérience. — Le 21 février, le cobaye 14 (de 770 grammes) reçoit dans la cuisse le mélange de 1 c. c. de sérum avec 1 goutte de sang charbonneux. Il a un peu de tuméfaction.

En même temps le cobaye 10 (de 660 grammes) reçoit la même dose du sérum avec 1 goutte de sang septique. Il meurt le lendemain (18 heures après).

Ces expériences attestent, nous semble-t-il, la parenté étroite de ces deux microbes anaérobies. Les différences entre eux viennent de ce qu'ils sont habitués à vivre et se sont spécialisés

1. En corrigeant les épreuves, j'apprends que ce lapin est mort cachectique un mois plus tard.

pour ainsi dire sur des espèces animales différentes. C'est pour cela, sans doute, que l'action de notre sérum est moins forte vis-à-vis du vibrion septique que du *bacterium Chauvœi.*

IX

ACTION DU BACILLE DU CHARBON SYMPTOMATIQUE ASSOCIÉ A D'AUTRES BACTÉRIES

M. Roger a déjà constaté que le lapin, qui est naturellement résistant au charbon symptomatique, prend facilement cette maladie, lorsqu'on l'inocule avec du *bacterium Chauvœi* associé au *microbacillus prodigiosus.* Par contre, on sait qu'on peut empêcher le développement du charbon chez un lapin si on lui injecte, en même temps que la bactéridie charbonneuse, du bacille de Friedlaender. Les microbes ainsi ajoutés au virus soit pour renforcer leur action, soit pour la suspendre, agissent-ils d'une manière spécifique? Nous ne le pensons pas, et notre opinion est appuyée sur les expériences suivantes :

Expérience. — A une dose mortelle ordinaire (0,1 c. c. de sang dilué au 1/20) du virus du charbon symptomatique qui tue les cobayes en dix-huit heures au plus tard, on ajoute du bacille de Friedlaender, ce que l'on enlève sur une culture sur gélose au moyen d'une petite spatule de platine. Le mélange injecté dans la cuisse du cobaye 118 ne le tue qu'en 50 heures. On trouve les deux microbes dans le sang et le péritoine.

De même, un mélange de charbon symptomatique et de bacille pyocyanique fait périr le cobaye 86, seulement au bout de trois jours.

Enfin un mélange de charbon symptomatique et de *microbacillus prodigiosus,* fait dans les mêmes conditions, tue le cobaye 119 en quatre jours.

C'étaient alors surtout les effets du charbon symptomatique associé au *microbacillus prodigiosus* que nous avons étudiés. L'expérience que nous venons de rapporter a été faite sur un second cobaye, en ajoutant une plus grande quantité de *m. prodigiosus;* l'animal en est mort en 3 jours. De sorte que le même microbe qui facilite le développement du charbon symptomatique chez le lapin, espèce réfractaire, le retarde considérablement chez le cobaye, espèce beaucoup plus sensible à la maladie. Cet effet préservateur du *prodigiosus* est dû à l'appel des phagocytes au point d'inoculation et à une stimulation de ces cellules migra-

trices. Pour exalter leur action, nous avons essayé d'injecter aux cobayes des doses répétées de cultures de *prodigiosus* stérilisées par la chaleur. Nous avons constaté que cette bactérie, que l'on regarde d'ordinaire comme un saprophyte innocent, tue fort bien les cobayes à la dose de 1/8 à 1/6 d'une culture sur gélose âgée de 4 jours, lorsque l'injection est faite dans le péritoine.

On peut aussi accoutumer les animaux à l'action du *prodigiosus*, par l'introduction préalable d'une petite quantité du microbe vivant sous la peau, avant d'injecter le mélange du *prodigiosus* et du charbon symptomatique.

Expérience. — Le cobaye 105 est inoculé sous la peau avec une petite quantité de *prodigiosus* vivant. La petite tumeur qui en résulte est résorbée en trois semaines. C'est alors que nous l'éprouvons avec une spatule de *prodigiosus* mélangée à 0,1 c. c. d'une solution au 1/20 de charbon symptomatique. Il a un très fort gonflement dans la cuisse, puis un abcès qui s'ouvre huit jours après. Mais l'animal a résisté.

Les quatre cobayes n°s 9, 153, 168 et 169 reçoivent chacun quatre fois la dose de 1/20, 1/30 d'une culture de *prodigiosus* sur gélose chauffée à 60°, et cela à des intervalles de 2-3 jours; un contrôle journalier des poids nous aide à ménager les animaux. Deux jours après la dernière dose, le cobaye 169 reçoit le mélange des 2 microbes (1 spatule de *prodigiosus*, plus 0,1 c. c. de charbon au 1/20). Il meurt en 3 jours, avec le mélange des 2 microbes dans le péritoine. Supposant que la dose du *prodigiosus* avait été trop forte, nous n'en mettons qu'une trace dans le mélange qui sert à éprouver le cobaye 168. Il a eu un abcès avec formation d'une fistule, mais il a résisté définitivement.

Ces deux expériences nous ont donc appris l'importance de la quantité de *prodigiosus* ajoutée : il faut en mettre assez pour exciter l'action phagocytaire, mais pas trop, sans quoi on produirait une intoxication de l'animal. Les deux cobayes, n° 153 et n° 9, traités avec le *prodigiosus* chauffé : avec les témoins n° 180 et n° 181, ont été éprouvés dans les conditions suivantes.

Expérience. — Le cobaye n° 9 (de 500 gr.) traité avec le *prodigiosus*, reçoit une trace de *prodigiosus*, à peu près 1/3 de ce qu'on peut recueillir avec la spatule, avec 0,1 c. c. d'une solution au 1/20 de charbon symptomatique. Il a un abcès avec fistule.

Le cobaye n° 181 (de 700 gr.), qui n'était pas traité au préalable avec le *prodigiosus* chauffé, reçoit exactement la même chose que le 9. Il meurt trois jours après.

Le cobaye n° 153 (de 530 gr.), qui a reçu du *prodigiosus* chauffé, est

éprouvé avec la même dose de charbon symptomatique, mais sans *prodigiosus*. Il meurt en 18 heures.

Le cobaye n° 180 (de 320 gr.), qui sert de témoin, reçoit la même dose de charbon symptomatique pur. Il meurt en 16 heures.

Nous avons donc suspendu nettement le développement du charbon symptomatique par le mélange du virus avec le *prodigiosus*. Si l'association avec un même microbe peut favoriser le développement du charbon symptomatique chez le lapin, espèce naturellement réfractaire, et par contre, en empêcher le développement chez le cobaye, espèce extrêmement sensible à la maladie, il nous paraît évident que l'action de ce microbe associé ne peut avoir rien de spécifique. Les deux phénomènes s'expliquent d'une façon naturelle par l'action du microbe sur les phagocytes. Dans le premier cas, il les paralyse; dans le second, il les excite.

Ces faits ont encore un autre intérêt. Pour étudier une maladie, on cherche toujours à expérimenter avec un virus pur. Mais il ne faut pas oublier que c'est une exception dans la nature qu'une infection simple ou pure, et que les infections mixtes y sont la règle. Nous osons même dire que cela est souvent heureux pour nous. Cet exemple de l'association d'un microbe pathogène avec un microbe banal, dont nous venons d'étudier l'effet, nous paraît se rapprocher beaucoup plus des conditions naturelles que l'infection par le microbe pathogène isolé. Ce sont surtout les microbes qui sont les hôtes ordinaires de l'homme et des animaux, et qui se trouvent sur les téguments ou dans les organes en communication avec l'extérieur, qui sont intéressants à étudier au point de vue des associations avec les virus.

C'est par cette idée que nous terminerons l'exposé de ces recherches, faites sous la direction de notre maître, M. le Dr Roux. Nous sommes heureux de profiter de cette occasion pour le remercier encore une fois de ses conseils journaliers, de sa critique continuelle, qui nous ont guidé dans notre travail et qui, seuls, l'ont rendu possible. Merci de même à notre cher ami M. le Dr C. Nicolle, professeur suppléant à Rouen, qui a bien voulu nous aider dans la rédaction de ce mémoire.

ÉTUDES SUR LA RAGE

PAR MM. BABES ET AL. TALASESCU

(Travail de l'Institut de pathologie et de bactériologie de Bucarest).

I

EXPÉRIENCES FAITES POUR MONTRER LA VALEUR DE LA CAUTÉRISATION DE LA PLAIE, PRODUITE PAR LA MORSURE D'UN ANIMAL ENRAGÉ

L'importance de la cautérisation, après la morsure d'un animal enragé, a été toujours reconnue : la statistique de M. Proust montre 76 morts parmi 117 mordus non cautérisés, et 89 décés sur 249 personnes cautérisées. La même conclusion ressort aussi de la statistique de l'Institut Pasteur et de celle de notre Institut.

Il était cependant nécessaire de demander à l'expérimentation une notion plus précise sur l'efficacité de la cautérisation.

De nos expériences (*Connaissances médicales*, 1887) sur l'action des différents agents antiseptiques, il résulte que le virus rabique est très sensible, surtout à l'action de la chaleur. Une température de 40° C. tue le virus en quelques heures ; une température de 58° l'atténue déjà après 5 minutes. A 60°, le virus est détruit en 30 minutes environ ; à 65°, en quelques minutes ; à 70°, presque immédiatement. Le mélange de moelle filtrée sur papier Joseph avec 1 : 1,000 sublimé ou 1 : 100 acide phénique conserve sa virulence pendant plusieurs heures. Il la conserve encore de 15 à 30 minutes, avec 5 0/0 d'acide phénique ; il s'atténue au contraire en 15 minutes, au contact de la solution de Gram. Les acides minéraux forts tuent le virus presque immédiatement.

Ces substances pourraient servir à détruire le virus rabique dans une plaie, si on pouvait l'atteindre avant sa résorption, qui se fait très vite ; ainsi, en inoculant le virus dans un nerf, même

si on coupe le nerf après quelques minutes dans une étendue d'un centimètre, l'infection se produira.

Voici une série d'expériences pour montrer l'effet des cautérisations pratiquées chez le chien : après avoir produit des lésions analogues aux plus graves morsures à la face, telles que section de la paupière, plaies profondes jusqu'à l'os dans la région supra-orbitaire avec section du nerf supra-orbitaire, plaie profonde avec section du nerf facial près de sa sortie, on a imprégné toutes ces plaies avec la moelle de lapins morts de rage fixe.

Après des temps différents, 8 de ces chiens ont été profondément cautérisés avec le thermocautère de Paquelin.

CAUTÉRISÉS APRÈS L'INFECTION				RÉSULTAT
N° 1.	Après	7	minutes.	Vit encore après 8 mois.
— 2.	—	10	—	Mort de rage après 50 jours.
— 3.	—	25	—	Vit encore après 8 mois.
— 4.	—	60	—	Mort de rage après 20 jours.
— 5.	—	2	heures.	— — 25 —
— 6.	—	5	—	— — 19 —
— 7.	—	24	—	Vit encore après 8 mois.
— 8.	—	24	—	Mort après 24 jours.
— 9.	Non cautérisé (contrôle).			— 18 —
— 10.	—		—	— 21 —

La même expérience faite avec des lapins donne le résultat suivant :

CAUTÉRISÉS APRÈS L'INFECTION				RÉSULTAT
N° 1.	Après	5	minutes.	Survit.
— 2.	—	5	—	Mort après 34 jours enragé.
— 3.	—	10	—	Survit.
— 4.	—	10	—	Mort de rage après 20 jours.
— 5.	—	20	—	Survit.
— 6.	—	20	—	—
— 7.	—	25	—	Mort après 19 jours, de rage.
— 8.	—	30	—	— 13 —
— 9.	—	30	—	— 14 —
— 10.	—	40	—	— 17 —
— 11.	—	40	—	— 14 —
— 12.	—	60	—	— 18 —
— 13.	—	60	—	— 14 —
— 14.	Non cautérisé.			— 14 —
— 15.	—			— 16 —

Le même effet est produit par la cautérisation profonde avec des acides forts. En badigeonnant la plaie infectée avec de la teinture d'iode, et en faisant des injections d'un gramme de la même substance autour de la plaie, 10 minutes après l'injection, on a arrêté deux fois l'éclosion de la maladie chez le chien.

Il résulte de ces recherches que, même après 5 minutes, la cautérisation des plaies profondes et graves ne garantit pas d'une manière certaine contre l'évolution de la maladie; toutefois ce moyen n'est pas négligeable; car si on emploie la cautérisation dans les 30 premières minutes après la morsure, on sauve la moitié des animaux qui, sans ce procédé, mourraient sûrement de la rage. On voit qu'exceptionnellement on peut même sauver des chiens en appliquant ce procédé 24 heures après l'infection.

Mais il résulte de ces essais encore un autre fait important, c'est que, par la cautérisation, on peut retarder l'éclosion de la rage, ce qui, justement dans les cas graves, est de la plus haute importance; car, en gagnant du temps, la vaccination antirabique peut devenir efficace dans des cas où la maladie, par sa gravité même, aurait eu tendance à se déclarer trop tôt. On voit en effet que même si la maladie éclate après cautérisation pratiquée dans les premières 30 minutes depuis l'infection, elle est retardée de plusieurs jours et même des semaines. Enfin, on peut recommander l'injection de teinture d'iode autour de la plaie, comme un bon moyen d'arrêter ou d'atténuer l'infection.

II

ATTÉNUATION DU VIRUS RABIQUE PAR LE SUC GASTRIQUE; VACCINATION PAR LA VOIE DIGESTIVE

Beaucoup de savants, M. Pasteur lui-même, puis l'un de nous, Hœgyes et d'autres ont essayé de trouver des moyens d'atténuation qui puissent avantageusement remplacer la dessiccation des moelles rabiques. Cette dessiccation, quoique parfaitement efficace et régulière entre les mains de M. Pasteur et de ses élèves, offre, dans les Instituts moins bien installés, des difficultés pratiques, de nature à compromettre le résultat du traitement. Il serait sans doute préférable de pouvoir, avec la moelle et le cerveau d'un lapin rabique, faire une préparation stable et possible à

conserver. Mais les tentatives dans ce sens ont eu des résultats incertains et contestés en partie, de sorte qu'on est ordinairement revenu au procédé de Pasteur.

Dans ce dernier temps, l'un de nous avait ajouté au traitement très intensif un traitement avec l'hémato et sérothérapie antirabique (Voir *Annales de l'Institut Pasteur*, 1891). *Tizzoni* et *Centanni* ont publié[1] depuis des résultats étonnants sur le traitement antirabique au moyen de virus atténué par le suc gastrique artificiel. La destruction du virus rabique dans le tube digestif est depuis longtemps connue, mais on expliquait en partie l'inoffensivité du virus par cette voie, par la barrière épithéliale des muqueuses. C'est surtout Wyrsikowski[2] qui a démontré que le suc gastrique détruit rapidement le virus rabique.

Tizzoni et Centanni ont opéré avec le suc gastrique artificiel, et ont obtenu, par une digestion de 19 heures *in vitro*, une substance tout à fait inoffensive et vaccinale.

D'après nos recherches, l'action du suc gastrique naturel (obtenu par la fistule stomacale d'un chien normal), sur le virus rabique, est plus puissante que celle du sang immunisant ou de l'extrait de thymus. Pour un gramme de moelle virulente dans 10 grammes de suc gastrique à 20° (c'est la température à laquelle restent nos moelles pour le traitement antirabique), 4 heures 1/2 suffisent pour ôter à l'émulsion sa virulence. Ainsi un chien trépané et injecté sous la dure-mère avec du virus laissé 5 heures en contact avec le suc gastrique, reste sain. Sur trois chiens inoculés avec le virus atténué pendant 4 heures 1/2, deux restent sains et un meurt de rage. Sur trois chiens inoculés avec le virus qui a été en contact pendant 3 heures, deux gagnèrent la rage sans retard appréciable.

Du moment que le suc gastrique est capable de transformer le virus rabique en vaccin, il était intéressant d'essayer si l'ingestion de la substance nerveuse ne possède pas un pouvoir vaccinal. M. Nocard, s'appuyant sur quelques expériences, a affirmé que non. Nous avons choisi un chien de taille moyenne, qui a été nourri, du 15 au 30 septembre 1892, chaque jour avec deux cerveaux frais de lapins morts de rage fixe. Le 12 novembre,

1. *Deutsche Medicinische Wochenschrift*, 1892.
2. Wyrsikowsky, *Wratsch*, 1891, n° 38.

il est infecté sous la dure-mère avec le virus d'un loup enragé. En même temps, on en inocule un chien de contrôle. Le premier chien reçoit encore du 12 au 20 novembre, chaque jour, deux cerveaux de lapins morts de rage fixe. Le chien de contrôle gagne la rage le 25 novembre, tandis que le chien n° 1 est jusqu'à présent d'une parfaite santé.

Nous n'avons que cette expérience à citer, mais la question mérite, nous croyons, d'être l'objet d'une étude plus approfondie. Si M. Nocard a échoué dans cette voie, c'est peut-être qu'il n'a pas maintenu assez longtemps l'alimentation rabique de ses animaux d'expérience.

NOUVEAUX ESSAIS DE VACCINATION ET DE TRAITEMENT ANTIRABIQUE PAR LE SÉRUM D'ANIMAUX FORTEMENT VACCINÉS

Déjà, au commencement de l'année 1890, nous avons publié dans ces *Annales*, en collaboration avec M. Lepp, des résultats concluants sur la vaccination des chiens, même après morsure, avec le sang d'animaux très vaccinés. *C'étaient les premiers résultats positifs de vaccination contre une maladie naturelle, avec le sang des animaux immunisés.* Nous avons repris ces recherches, en collaboration avec M. Cerchez (ces *Annales* 1891, etc.) avec le même résultat, et nous avons introduit, en 1890, ce principe de vaccination dans le traitement antirabique chez l'homme. (*Annales de l'Institut de pathologie et de bactériologie*, 1891, Bucarest, vol. II.)

Comme nous possédons maintenant beaucoup de chiens très vaccinés, nous répétons et élargissons à l'aide de ces animaux, de temps en temps, nos recherches.

Tout d'abord, nous avons cherché lequel des éléments du sang préserve et guérit. Nos chiens immunisés et qui ont été infectés quatre et cinq fois, sous la dure-mère, avec le virus fixe, après avoir reçu plusieurs traitements forts et, de temps en temps, des quantités considérables (10 à 20 grammes) de virus fixe sous la peau, nous ont donné le sang que nous avons en partie inoculé à un chien tel qu'il était extrait. D'autres animaux recevaient *le sérum* et d'autres *les caillots* formés. Enfin, on a inoculé chez un autre chien le sang défibriné dont le caillot était incomplètement formé et dont le sérum était encore assez coloré.

a) Deux chiens ont reçu deux jours de suite, 5 c. c. de *sérum pur;* le lendemain ils ont été infectés par le virus fixe injecté dans le corps vitreux de l'œil, après avoir insensibilisé la conjonctive à l'aide de la cocaïne. Le même jour et les trois jours suivants ils reçoivent 10 c. c. de sérum pur, le quatrième jour 20 c. c.; après un intervalle de 6 jours, de nouveau deux jours de suite 10 et 15 c. c. de sérum. Les chiens sont encore vivants après un an et sept mois.

b) Un autre chien reçoit le même traitement, mais avec le sérum incomplètement décoloré et défibriné. Il succombe de la rage 19 jours après le commencement du traitement.

c) Deux autres chiens reçoivent la même quantité d'inoculation faite avec le *caillot*, passé à l'étamine, du sang des mêmes chiens. Ces deux animaux et un chien de contrôle meurent à peu près en même temps de la rage, 16-17 jours après l'infection.

Il résulte donc de ces expériences que c'est le sérum du sang qui est le plus efficace pour vacciner et pour guérir la rage, tandis que le sérum sanguinolent et le caillot ne peuvent pas empêcher la rage après une *infection très forte.*

On sait que les lapins sont beaucoup plus difficiles à vacciner contre une forte infection que les chiens. L'un de nous avait obtenu, il y a longtemps, par la vaccination pasteurienne, deux lapins réfractaires contre l'infection sousdurale avec le virus fixe, tandis que, dans d'autres essais très nombreux, nous avons toujours échoué. Dans nos recherches publiées dans ces *Annales*, on trouve des résultats partiels, c'est-à-dire une prolongation remarquable de la durée d'incubation, produite par une vaccination antérieure avec du sang des chiens immunisés. En répétant ces expériences, voici nos résultats :

a) Un lapin de 1,000 grammes reçoit les 9, 11 et 14 juillet 1892, 1,5 c. c. de sérum pur sous la peau; le 16 juillet il est inoculé dans le corps vitreux avec le virus fixe. Le 28, il est paralysé. Le 29, il reçoit 3 c. c. de sérum dans la veine jugulaire. Après une heure, il se lève et paraît être bien portant; on répète l'opération après deux heures; après cinq heures, il reçoit encore 3 c. c. de sérum pur dans le péritoine. 14 heures après la première injection thérapeutique, la paralysie recommence, et malgré une nouvelle injection péritonéale, l'animal succombe le lendemain.

b) Un autre lapin traité à la même époque, de la même manière, tombe malade avec un commencement de paralysie. Le 30 juillet, il est inoculé avec 3 c. c. de sang dans la veine jugulaire. Après deux heures, il se lève, commence à manger et reste bien portant pendant deux jours. Pendant ce temps, il reçoit quatre fois du sérum dans les veines et dans le péritoine. Le 2 août, la paralysie recommence, une nouvelle injection intra-

veineuse n'a qu'un effet passager et incomplet. La mort survient le 3 août.

c) Un troisième lapin de 900 grammes reçoit le même traitement. Il gagne la maladie seulement le 3 août et meurt après une amélioration de quelques heures, après une inoculation intraveineuse le 5 août, c'est-à-dire onze ou douze jours après la mort des deux lapins de contrôle, qui, après avoir été infectés le même jour et de la même manière, succombent le 25 et le 26 juillet à la rage fixe.

Cette série d'expériences montre déjà :

1° Que trois injections sous-cutanées de sérum, faites avant une infection intrabulbaire très forte, produisent un retard sensible dans la manifestation de la rage chez le lapin ;

2° Que, chez ces animaux, l'injection intraveineuse et intra-péritonéale du sérum, pratiquée après le commencement de la paralysie, produit une amélioration évidente, quoique passagère. Cette amélioration semble se produire seulement dans la rage atténuée ou retardée, car une autre série de lapins, inoculés sous la dure-mère avec le virus fixe, et traités de la même manière après l'apparition des premiers symptômes, n'éprouvaient aucune amélioration de leur état, après plusieurs injections intra-veineuses et péritonéales du même sérum.

Pour avoir une plus grande quantité de sérum immunisant, nous avons immunisé, par la méthode de Pasteur et de Galtier, deux moutons dont on a renforcé le pouvoir immunisateur du sang par des trépanations répétées et par l'inoculation sous-cutanée de grandes quantités de virus fixe, pendant un an. Le sang de ces moutons a été recueilli périodiquement, et le sérum précipité par l'alcool, séché dans le vide, et conservé sous forme de poudre. (Voyez nos expériences publiées au *Congrès d'hygiène de Londres*, 1891.)

a) 3 lapins ont été infectés sous la dure-mère avec le virus fixe et un autre dans le corps vitreux. Au début de la fièvre prodromique, ces animaux reçoivent chaque jour 0gr,25 du précipité dilué dans 10 grammes de bouillon. Mais ce procédé ne modifia en rien la marche de la maladie, et tous les lapins moururent le dixième jour.

b) En modifiant le traitement, on obtient au contraire des résultats remarquables. Ainsi, nous inoculons deux lapins de 1,100 grammes et de 1,000 grammes, les 9 et 17 octobre 1892, chaque jour avec 0gr,25 de précipité. Le 23/X, ces lapins et un lapin de contrôle sont infectés dans le corps vitreux avec le virus fixe. Le lapin de contrôle meurt le 29/X de la rage fixe. Les deux lapins traités reçoivent le 24-29/X, de nouveau, du précipité. Le plus petit des lapins meurt de la rage le 1/XI, 3 jours après le

lapin de contrôle; l'autre lapin reste bien portant. Le 18/XI, il faiblit sans présenter des symptômes de la rage. On lui donne le 19/XI, 8 grammes et 4 grammes du sang de chien immunisé, et la même dose le jour suivant. Il vit encore un mois après, et meurt d'une maladie accidentelle, car sa moelle n'est pas virulente.

c) Le précipité alcoolique du sérum des chiens possède le même pouvoir vaccinatoire. Trois lapins de 1,000 à 1,200 grammes reçoivent, du 19/XI jusqu'au 1/XII 1892, chaque jour 0gr,30 de précipité du sérum de chien fortement vacciné. Le 5/XII, ils sont infectés dans le corps vitreux avec le virus fixe, en même temps qu'un lapin de contrôle qui succombe neuf jours après de la rage fixe. Les lapins vaccinés reçoivent les 7, 9 et 11/XII, encore 0gr,30 du précipité. *Ils survivent tous.* Parmi les lapins vaccinés, l'un meurt le 24/XII avec cachexie, sans symptômes de la rage; l'autre succombe le 24/XII sans lésions de la rage, et le troisième meurt d'une pleuropneumonie le 30/XII. Un quatrième lapin, qui a été seulement vacciné avec les autres sans être infecté, meurt de cachexie le 20/XII. Les moelles de ces lapins n'étaient pas virulentes.

Cette série d'expériences montre donc qu'on peut vacciner les lapins, même contre le virus le plus fort, par des injections des précipités alcooliques du sérum de sang des chiens fortement immunisés. Le même résultat a été obtenu avec le précipité du sérum d'un mouton récemment immunisé, de sorte que cette dernière expérience semble montrer que, pour la vaccination de la rage, on n'a pas besoin du sang des moutons immunisés depuis longtemps.

Il est regrettable que les lapins, vaccinés avec le sang ou le précipité de sang des moutons ou des chiens, succombent à la fin à une cachexie générale, de sorte qu'on ne peut pas continuer les expériences au delà de deux mois. Cette cachexie tient, probablement, en partie, à ce que le sang qu'on leur a inoculé est un peu toxique pour eux. Cette toxicité du sang d'une espèce pour une autre espèce a été constatée par Rummo. L'un de nous (Babes) avait observé, il y a longtemps, que pour vacciner avec du sang, il est préférable de se servir du sang de la même espèce. Ainsi, avec du sérum de chiens, on peut vacciner avec plus de sûreté un chien que d'autres animaux. Cependant, comme l'action du virus fixe, inoculé sous la dure-mère ou dans le corps vitreux, est absolument sûre et régulière, on peut pour le moment faire abstraction, dans les expériences mentionnées, de cette mort tardive par cachexie; il suffit de constater la propriété que possède le sérum d'empêcher la manifestation de la rage.

On verra la même chose dans les expériences suivantes, faites avec du sérum liquide, où le traitement avait commencé après l'infection intrabulbaire *avec du virus du loup*.

a) 5 lapins de 1,000-1,200 grammes ont été inoculés le 14/VIII/1892, avec la moelle d'un loup enragé. Les deux lapins de contrôle succombent après 12 et 14 jours, à la rage paralytique. Un autre reçoit après 7 jours, le 21/VIII et les deux jours suivants, 0gr 35 du précipité de sérum de chien, et ensuite chaque jour, jusqu'au 2/IX, 5 grammes de sérum liquide de mouton et de chien. Il succombe le 3/IX d'une manière brusque; sa moelle n'est pas virulente.

b) Une autre lapin reçoit, 7 jours après l'injection et les jours suivants, 5-15 grammes de sérum; ce traitement continue avec des intervalles jusqu'au 9/IX, jour où il est trépané avec le virus fixe. Il succombe le 18/IX, sans symptômes de rage, et sa moelle n'est pas virulente.

c) Un troisième lapin a été traité de la même manière, mais avec des doses plus faibles (4 c. c. à la fois); on l'infecte le 9/IX sous la dure-mère avec le virus fixe, et il vit encore le 6/XII, jour où on se sert de son sang pour vacciner d'autres lapins. Il faut remarquer que ce lapin ne recevait pas de doses aussi grandes de sérum que le précédent, qui avait reçu jusqu'à 15 c. c. par jour.

Les mêmes expériences ont été faites avec le virus fixe.

a) On commence d'injecter, le 26/X/1892, à trois lapins de 1,200-1,400 grammes, 5 c. c. de sérum de chien immunisé, pendant 35 jours, presque chaque jour. Le 5/XII, ils sont inoculés dans le corps vitreux avec le *virus fixe*.

Après trois jours l'un d'eux succombe à une pleuropneumonie.

b) Le deuxième lapin, traité de la même manière, survit à l'infection intraoculaire de virus fixe, après avoir reçu encore du 6 au 12/XII 4 grammes, et du 13 au 15, 10 grammes de sérum de chien par jour.

c) Le troisième lapin, traité de la même manière, gagne la rage 15 jours après l'infection intra-oculaire, tandis que le lapin de contrôle succombe le dixième jour après la même injection.

Tandis que dans 20 expériences nous ne réussissons pas à sauver les lapins infectés par la trépanation avec du virus fixe en leur injectant *ensuite* du sérum de sang de chien, nous avons eu deux succès sur trois expériences, en employant le *sérum des lapins rendus réfractaires* contre l'action du virus fixe.

Le 6/XII 1892, on infecte 6 lapins sous la dure-mère avec le virus fixe. Trois de ces lapins servant de contrôle succombent le 8e jour, à la rage fixe.

Deux des trois autres sont traités de la manière suivante :

Ils reçoivent immédiatement après la trépanation :

Le	6/XII	4 grammes de sérum de	lapin		*dans le péritoine.*
—	7/XII	2	—	—	—
—	8	2	—	—	—
—	9	4	—	—	—
—	10	4	—	—	sous la peau.
—	10	6	—	de chien	—
—	11	8	—	—	—
—	12	8	—	—	—
—	13	10	—	—	—
—	14	5	—	—	*dans le péritoine.*
—	14	5	—	—	sous la peau.
—	14	5	—	—	dans les muscles.

Ces deux lapins sont encore bien portants après trois mois. Le troisième *lapin*, traité presque de la même manière, succombe de la rage le 17/XII/92, c'est-à-dire avec un retard de 5 jours, ce qui est très remarquable, vu le mode d'infection. Ce lapin avait reçu, les 7, 8, 9/XII, la même quantité de sang de lapin que les lapins qui ont survécu, *mais sous la peau*, tandis que les lapins qui ont survécu ont reçu ce sérum dans le péritoine. Une autre cause du succès moins complet chez cet animal a été peut-être que le lapin qui a donné le sang pour sa vaccination était moins vacciné que les lapins qui ont fourni le sang pour vacciner les deux autres.

L'IMMUNITÉ HÉRÉDITAIRE

On pourrait supposer, surtout après les publications de Bardach, de Högyes et de Tizzoni, qu'une forte immunisation serait capable de donner ordinairement une immunité héréditaire. En effet, ces auteurs décrivent des cas où, le père et la mère étant immunisés, les petits résistaient à l'infection antirabique. Une expérience faite en ce sens dans notre Institut montre que cette immunité héréditaire n'est pas la règle.

Comme nous disposons toujours d'un grand nombre de chiens très vaccinés, nous avons accouplé deux de ces chiens qui possèdent un sang très efficace comme vaccin, et qui avaient reçu des quantités énormes de virus fixe sous la peau et 5 fois sous la dure-mère.

Le 8 juillet 1892, la femelle met bas et allaite ses 4 petits.

Le 22 août, on infecte trois des petits avec le virus des rues dans le bulbe oculaire.

Le 7 septembre, les trois petits chiens montrent les symptômes de la rage et ils succombent les 19 et 20 septembre. A la

même date, les parents sont infectés sous la dure-mère, avec le virus fixe, mais ils restent bien portants.

VACCINATION DES CHIENS PAR LE VIRUS FIXE

Nous citerons un nouvel exemple à ajouter à ceux qu'on a déjà de vaccination des chiens par du virus fixe déposé dans le tissu cellulaire.

Nous avons injecté le 9 octobre 1892 et le 1er septembre 1893, à une série de 6 chiens, dans le tissu sous-cutané des flancs, 1 c. c. d'une émulsion de virus fixe à 1/10.

Les trois jours suivants, ils reçoivent 1,5 c. c. de virus fixe et les trois jours suivants 2 c. c.

Une première série de 4 chiens reçoit, en même temps qu'un chien de contrôle, 32 jours après le commencement de ce traitement, une injection intracranienne avec le virus du loup enragé. Le même jour, on reprend la vaccination avec 5 grammes de virus fixe par jour, pendant huit jours. Les quatre chiens sont encore bien portants, tandis que le chien de contrôle meurt de la rage le 25 novembre, 13 jours après la trépanation.

Les deux chiens de la seconde série reçoivent du 4-14 octobre 1893, chaque jour, 5 à 10 grammes d'émulsion de virus fixe. Ils sont infectés le 20 octobre sous la dure-mère avec le virus fixe, sans gagner jusqu'à présent la rage. Depuis la première expérience, nous avons encore plusieurs fois vacciné des chiens avec du virus fixe sans en perdre un seul par la rage.

LETTRE de M. le D^r Em. PUSCARIU

Directeur de l'Institut antirabique de Jassy

A M. PASTEUR

Monsieur Pasteur, à Paris.

Nous avons l'honneur de vous adresser la statistique établie pour notre Institut, depuis sa création jusqu'au 1er mai 1894. Si, jusqu'à présent, nous ne vous avons pas fait connaître l'existence de cet Institut, c'est que nous voulions, avant de vous en faire part, arriver à un résultat satisfaisant; aujourd'hui, après avoir traité 360 cas, et la mortalité n'ayant été que de 0,27 0/0, nous croyons qu'il est de notre devoir de vous communiquer les résultats obtenus par votre traitement.

L'Institut antirabique de Jassy a été créé comme une institution qui s'imposait pour notre pays, au mois de juin 1891; il a commencé à fonctionner régulièrement le 6 août suivant, jour où il a reçu et traité le premier malade.

Les fondateurs en étaient : le regretté docteur *Eugène Rizou*, ancien doyen de la Faculté de médecine de Jassy, directeur du laboratoire de thérapeutique expérimentale près la chaire de pharmacologie, un des meilleurs élèves de l'école française de *Montpellier*, et le soussigné, professeur d'histologie de la même Faculté de Jassy, et ancien assistant de l'Institut de bactériologie de Bucharest.

L'Institut fonctionnait à cette époque comme service annexé au laboratoire de thérapeutique, recevant une subvention du ministère de l'Instruction publique.

Au mois de décembre 1882, après la mort prématurée du docteur Rizou, le service antirabique devint une institution indépendante de la Faculté, en passant sous le contrôle immédiat du Service supérieur sanitaire, grâce à la sollicitude de son savant directeur, le docteur *Félix*. Depuis lors, la direction de

l'Institut resta confiée au soussigné, assisté par le docteur *Lebell* et le docteur *Vesesco*.

Le procédé employé dans le traitement est le vôtre, auquel nous avons apporté les modifications suivantes :

1° La durée du traitement est plus longue (de 20 à 35 jours), ainsi qu'on le pratique à l'Institut de bactériologie de Bucharest;

2° Depuis une année et demie, les moelles, au lieu d'être triturées avec du bouillon, sont préparées dans une émulsion de virus fixe, laquelle est en proportion d'un cerveau de lapin pour 100 c. c. d'eau distillée, filtrée à la trompe, et stérilisée à 80° pendant 15 minutes.

Nous avons introduit cette modification en nous appuyant sur les expériences faites d'abord par moi, en collaboration de MM. *Babes* et *Lepp* (*Annales de l'Institut Pasteur* 1889), et répétées plus tard avec plus de succès dans notre Institut sur un grand nombre d'animaux. Dans ces expériences, nous étions guidés par l'idée exprimée par vous, dans votre lettre à M. Duclaux en 1886, qu'à côté de la substance virulente de la rage, il existait probablement une matière chimique vaccinante plus résistante que le virus rabique; c'est ainsi qu'en tuant le virus vivant par une température qui ne détruit pas la matière vaccinante, nous avons cru obtenir cette dernière d'une manière analogue aux résultats obtenus par vous, en collaboration avec M. Viala, et communiqués à l'Académie des sciences.

Agréez, cher maître, l'assurance de notre plus haute admiration.

Le Directeur de l'Institut antirabique de Jassy,
Prof. Dr Émile Puscariu.

Voici pour chaque année : — 1° le nombre des personnes traitées; — 2° le nombre des morts pendant le traitement ou dans la quinzaine qui a suivi la dernière inoculation; — 3° le nombre des morts après cette période; — 4° le pourcentage de la mortalité.

Années	1°	2°	3°	4°
1891	34	0	0	0
1892	133	2	0	0
1893	144	1	1	0,7
1894	50	1	0	0
	361	4	1	0,27 %

STATISTIQUE DE L'INSTITUT ANTIRABIQUE DE JASSY

DU 6 AOUT 1891 AU 1er MAI 1894

	A			B			C		
Morsures à la tête et à la figure — simples	»	8	19	»	»	1	»	6	19
Morsures à la tête et à la figure — multiples	»	11		»	1		»	13	
Cautérisations efficaces	»	»	»	»	»	»	»		»
— *inefficaces*	2	»	»	1	»	»	3	»	»
Pas de cautérisation	17	»	»	»	»	»	16	»	»
Morsures aux mains — simples	»	15	66	»	9	14	»	22	53
Morsures aux mains — multiples	»	51		»	5		»	31	
Cautérisations efficaces	5	»	»	1	»	»	3	»	»
— *inefficaces*	9	»	»	1	»	»	14	»	»
Pas de cautérisation	32	»	»	12	»	»	36	»	»
Morsures aux membres et au tronc — simples	»	11	37	»	3	9	»	31	87
Morsures aux membres et au tronc — multiples	»	26		»	6		»	56	
Cautérisations efficaces	»	»	»	3	»	»	4	»	»
— *inefficaces*	8	»	»	1	»	»	7	»	»
Pas de cautérisation	29	»	»	5	»	»	76	»	»
Habits déchirés	25	»	»	7	»	»	51	»	»
Morsures à nu	12	»	»	2	»	»	36	»	»
Morsures multiples en divers points du corps			16			10			12
	»	»	»	5	»	»	»	»	»
Cautérisations efficaces	»	»	»	»	»	»	»	»	»
— *inefficaces*	»	»	»	»	»	»	»	»	»
Pas de cautérisation	16	»	»	5	»	»	12	»	»
Habits déchirés	15	»	»	7	»	»	»	»	»
Morsures à nu	1	»	»	3	»	»	12	»	»
Totaux.		138			34			171	
		A			B			C	
TOTAL GÉNÉRAL					343				

La colonne A se rapporte toujours aux cas dans lesquels la rage de l'animal mordeur était certaine; la colonne B à ceux où la rage était constatée par examen vétérinaire: la colonne C aux cas ou la rage était seulement probable.

Il faudrait ajouter au tableau 18 cas dans lequel l'animal mordeur était simplement suspect de rage, en tout 361 cas.

Les animaux mordeurs ont été : loup, 26 fois; homme, 3 fois; cheval, 1 fois; chat, 6 fois; chien, 325 fois.

Le Gérant : G. MASSON.

Sceaux. — Imprimerie Charaire et Cie.

8me ANNÉE — JUILLET 1894. — N° 7.

ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

ÉTUDE CLINIQUE ET BACTÉRIOLOGIQUE SUR LA DIPHTÉRIE

PAR MM. A. CHAILLOU ET LOUIS MARTIN

Internes des hôpitaux.

(Travail du Laboratoire de M. le Dr Roux à l'Institut Pasteur.)

Les nombreux savants, qui ont écrit dans ces derniers temps sur le diagnostic de la diphtérie, s'accordent à reconnaître que dans les angines blanches, seul l'examen bactériologique peut fournir un diagnostic certain. Nous ne reviendrons pas sur ce sujet et nous considérerons cette vérité comme définitivement acquise.

Ce diagnostic a été préalablement établi dans toutes les observations qui forment la matière de ce travail et qui se rapportent à tous les enfants entrés au pavillon de la diphtérie dans le service de notre maître, M. le docteur Jules Simon, pendant les derniers mois de l'année 1892.

Appuyés sur cette base solide, nous pourrons nous rendre compte de la valeur diagnostique et pronostique de chacun des signes relevés au lit des malades et voir si à chacune des angines pseudo-membraneuses que distingue la bactériologie ne correspond pas un tableau clinique particulier. Une fois le diagnostic posé, c'est dans l'examen de l'état général, de l'adénopathie, de l'albuminurie, dans celui des courbes de température, du pouls, de la respiration que nous trouverons les meilleurs renseignements sur la marche de la maladie, car aucun symptôme pris à part n'est suffisant pour établir un pronostic.

Assurément, toutes ces questions ne sont pas nouvelles; mais les auteurs qui ont écrit sur ce sujet ne partaient pas d'un

diagnostic absolument sûr. Ce diagnostic, il nous a été facile de l'établir pour près de 200 nouveaux cas, grâce aux enseignements de M. Roux, qui nous a fourni tous les moyens pour mener à bien ce travail. Qu'il accepte nos sincères remerciements.

Dans toutes les observations, chaque jour, nous avons noté la température rectale du matin et du soir; une fois par jour et à la même heure, nous avons examiné la respiration et le pouls. Ces observations quotidiennes nous ont permis de construire les courbes de la température, du pouls et de la respiration.

De plus, tous les jours nous avons recherché l'albumine dans les urines au moyen de la chaleur et de l'acide nitrique; les deux procédés se contrôlent l'un l'autre et fournissent des données suffisamment exactes. Nous avons adopté les 5 divisions suivantes pour noter la quantité d'albumine : traces, quantité appréciable, quantité notable, grande quantité, abondance d'albumine : cette division, sans être rigoureuse, suffit largegement aux besoins de la clinique.

L'albuminurie apparaît, le plus souvent, dans les premiers jours de la maladie, d'autres fois beaucoup plus tard ; nous disons que l'albuminurie est *précoce* quand elle existe du premier au septième jour de la maladie; nous appelons albuminurie *tardive* celle qui se montre après le septième jour.

Dans l'étude des adénopathies, nous distinguons l'adénopathie cervicale de l'adénopathie sous-maxillaire. Les ganglions sous-maxillaires sont rarement engorgés dans la diphtérie; les ganglions cervicaux le sont presque toujours. Les ganglions engorgés sont situés au-dessous de l'angle du maxillaire inférieur, au-dessus de la grande corne de l'os hyoïde, au-devant du muscle sterno-cleido-mastoïdien : c'est là, en effet, que se rendent les lymphatiques des amygdales, du pharynx et du larynx[1].

1. Voici, d'après M. Walther, la topographie des ganglions sous-maxillaires et cervicaux (*Traité de chirurgie* de MM. Duplay et Reclus, t. V, page 679) :

Ganglions sous-maxillaires (8-10) : occupent la loge de la glande sous-maxillaire ; sont placés la plupart dans l'angle formé par le mylo-hyoïdien et la face interne de la mâchoire osseuse et reçoivent les lymphatiques du front, des paupières, *du nez, des joues, des lèvres, des gencives* inférieures de la muqueuse buccale et d'une partie de la langue.

Ganglions cervicaux supérieurs : — Les uns sont superficiels, placés le long du bord antérieur et de la face externe du sterno-hyoïdien. Il en est qui longent la jugulaire externe : ils se trouvent entre le muscle précédent et le peaucier. Reçoivent les lymphatiques des gencives supérieures, du palais.

Les autres sont profonds, occupent notamment le point de bifurcation de la

Notre travail porte sur 198 cas divisés comme il suit :

Angines	99
Croups	99

ANGINES

Dans les angines nous établirons les subdivisions suivantes :

Angines non diphtériques	29	Morts	0
Angines diphtériques pures	44	Morts	10
Angines diphtériques avec associations	26	Morts	18

ANGINES BLANCHES NON DIPHTÉRIQUES

Nous avons pu observer 29 angines blanches non diphtériques, soit près du tiers des angines étudiées et le septième des enfants entrés au pavillon. Ce chiffre est moins élevé que dans le premier travail de l'un de nous [1]. Deux raisons peuvent expliquer cette différence ; dans le premier cas nous opérions en été : ces nouvelles observations ont été prises pendant l'hiver. A cette époque de l'année, le nombre des angines blanches non diphtériques est moins considérable qu'en tout autre temps. La seconde raison est que, dans le premier travail, nous n'avions pas pu examiner les enfants très malades qui succombaient rapidement après leur entrée ; ici nous avons systématiquement observé tous les malades sans aucune exception ; dans ces conditions, la proportion des erreurs de diagnostic reste encore considérable.

Angines à coccus. — Sous ce titre nous comprendrons, non pas les angines où on trouve un coccus quelconque, mais celles où, après 24 heures d'étuve à 37°, l'ensemencement sur sérum donne des colonies arrondies, isolées, bien développées, qu'un examen superficiel ferait prendre pour des colonies diphtériques. Lorsqu'on les étudie de plus près, elles paraissent peu saillantes, leur centre n'étant pas plus épais que leur périphérie ; elles sont transparentes, et le microscope montre qu'elles sont constituées

carotide et le voisinage du tronc thyro-linguo-facial. Ils sont les aboutissants des lymphatiques du cuir chevelu, de l'oreille, de la *cavité buccale*, de la langue, *des amygdales, du pharynx, de la trachée* et de l'œsophage.

1. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1892.

par un petit coccus dont les grains sont isolés ou disposés deux par deux, jamais en chaînette.

Nous avons pu réunir 11 cas d'angines à coccus. Chez cinq enfants les fausses membranes ont disparu avant le quatrième jour, chez les six autres elles ont persisté plus de six jours, une fois jusqu'à onze jours. C'est le cas de notre n° 1, enfant de treize ans.

Dans les 5 premières observations on note des points blancs, quelquefois d'un seul côté, le plus souvent sur les deux amygdales; dans les six autres, les fausses membranes persistent longtemps, et elles occupent les amygdales, envahissent quelquefois les piliers et même les fosses nasales (n° 197). Nous devons aussi faire remarquer que leur extension au larynx est fréquente : cinq de ces malades ont eu la toux rauque et par moments la voix voilée; alors il n'y a pas simplement inflammation des cordes vocales : la fausse membrane envahit bien réellement le larynx, car il existe des croups qui nécessitent la trachéotomie et qui sont causés par ce même coccus : nous les étudierons en temps voulu.

Ces fausses membranes se rapprochent beaucoup des fausses membranes diphtériques; cependant elles sont plus blanches, plus crémeuses, moins adhérentes, moins consistantes et moins élastiques; mais il est presque impossible de les distinguer des fausses membranes qui se rencontrent dans les angines diphtériques bénignes. Bien qu'en général elles se reproduisent moins rapidement, leur persistance pendant neuf, dix et onze jours prouve qu'elles peuvent simuler de véritables fausses membranes diphtériques.

Tous ces malades ont eu de l'adénopathie des ganglions cervicaux. Un seul, celui qui présentait du jetage avec fausses membranes à l'orifice antérieur des fosses nasales, avait de l'engorgement des ganglions sous-maxillaires. Les ganglions sont ordinairement assez volumineux, quelquefois douloureux à la pression, comme dans l'angine diphtérique. Dans un cas (73) ils étaient considérablement tuméfiés et empâtés: mais alors, avec le coccus, on constatait un assez grand nombre de streptocoques. L'adénopathie de ces angines à coccus ne diffère en rien de celle qui accompagne l'angine diphtérique.

Un point important est la présence de l'albumine dans l'urine; nous l'avons trouvée chez cinq malades. C'est ordinairement du

sixième au dixième jour qu'elle apparaît. Elle persiste 2, 3 jours, chez les nos 1, 73 et 118, dure cinq jours chez les nos 12 et 17. En réalité, l'albuminurie existe presque dans la moitié de nos observations et dans tous les cas les plus sérieux.

Ces angines s'accompagnent de fièvre; la température peut atteindre ou dépasser 39°, elle s'abaisse en même temps que les fausses membranes disparaissent.

Le pouls, plus rapide dans les premiers jours (120, 130), suit ordinairement les oscillations descendantes de la température.

Le rythme respiratoire ne présente pas une grande accélération, même lorsqu'il existe des troubles laryngés, et le plus souvent on note de 25 à 30 respirations par minute.

L'état général est ordinairement très bon, le facies est rosé, l'enfant conserve son appétit, reste gai, s'occupe de ceux qui l'entourent. Aussi, même pour les cas les plus sérieux, nous n'avons pas hésité à porter un pronostic favorable : bien que la présence de l'albumine dans l'urine, l'existence de l'engorgement ganglionnaire, l'aspect de la gorge engageassent plutôt à faire des réserves.

Tous ces enfants ont guéri sans aucune complication.

Angines à pneumocoque. Nous ne possédons qu'une seule observation d'angine à pneumocoque de Talamon Fraenkel; cela serait insuffisant pour décrire les angines à pneumocoque, qui nous semblent très rares chez l'enfant. Nous renvoyons ceux qui désirent connaître cette affection à la remarquable leçon de notre honoré maître M. le professeur Jaccoud[1].

Angines à staphylocoque. — Dans 4 observations, nous avons trouvé, dans les fausses membranes, à l'examen microscopique et dans les cultures sur sérum, de grandes quantités de staphylocoques, blanc et doré. Ces bactéries étaient-elles la seule cause de la maladie? Nous croyons que, dans ces cas, il serait nécessaire d'ensemencer les fausses membranes sur différents milieux, pour bien déterminer le rôle qui revient à chacun des microbes dans la production des fausses membranes. Nous nous contenterons de dire que ces angines ont été relativement bénignes.

1. *Semaine médicale*, 19 juillet 1893, page 346. *Journal de médecine et de chirurgie pratique*, 10 mars 1895.

Dans deux cas, nous avons eu des récidives; trois fois les fausses membranes occupaient les deux amygdales; une fois il y avait une plaque sur la luette; dans la quatrième observation, on notait une simple teinte opalescente sur les amygdales.

Les ganglions cervicaux étaient gros, quelquefois empâtés; dans une seule observation, les ganglions sous-maxillaires étaient engorgés en même temps qu'il y avait des fausses membranes sur les lèvres.

La température est toujours peu élevée; elle est même restée normale dans la seule observation où nous ayons trouvé de l'albumine dans l'urine.

Les enfants sont en général un peu pâles, fatigués, mais leur appétit est conservé.

Angines à bacilles indéterminés. Chez des enfants atteints d'angine, nous avons trouvé en abondance, dans la fausse membrane, au microscope et dans la culture sur sérum, un bacille qui ne se colore pas par la méthode de Gram, liquéfie le sérum et présente les formes et les dimensions du coli-bacille. Nous avons rencontré ce même microbe associé au bacille de la diphtérie dans des fausses membranes très épaisses et très étendues.

Les symptômes observés chez ces malades sont ceux des angines à coccus; une fois la toux était rauque; il n'y avait pas d'albumine dans l'urine.

Angines à streptocoques. — Nous possédons onze observations d'angines à streptocoques : trois de ces angines sont survenues chez des malades qui avaient une éruption scarlatineuse absolument typique dès le lendemain de leur entrée à l'hôpital.

Ces angines du début de la scarlatine ne sont pas diphtériques, ainsi que l'ont montré MM. Wurtz et Bourges[1].

Vingt-quatre heures après l'ensemencement, on voit à la surface du sérum un pointillé très abondant de très petites colonies, presque toutes formées par un streptocoque à très petits grains.

L'aspect des fausses membranes pourrait faire croire à la diphtérie, mais la rougeur écarlate du fond de la gorge met sur la voie du vrai diagnostic.

La température est en général très élevée, entre 39 et 40°, et le pouls bat environ 150 fois par minute.

Sitôt le diagnostic assuré, les malades ont été envoyés dans

1. *Archives de médecine expérimentale*, mai 1890.

le service des scarlatineux. Pour cette raison, nous n'avons pu suivre l'évolution de la maladie.

Dans les huit cas d'angines à streptocoques sans scarlatine, nos malades se sont présentés avec des fausses membranes blanc-grisâtres, adhérentes, qui occupaient les amygdales et envahissaient aussi les parties voisines, cinq fois la luette et quatre fois les piliers. Il est à noter, cependant, que nous ne trouvions pas ici une fausse membrane ininterrompue, tapissant tout l'isthme du gosier : les fausses membranes étaient disposées par larges plaques, qui n'avaient pas de tendance à se réunir. Entre ces plaques et tout autour d'elles, la muqueuse était ordinairement rouge, quelquefois œdématiée, soulevée en bourrelet.

Deux fois les fausses membranes avaient plutôt un caractère pultacé, et l'examen bactériologique nous a révélé l'association du streptocoque au staphylocoque.

Les ganglions sont toujours volumineux et souvent empâtés.

L'albumine existe dans les urines de 3 malades et persiste 3 jours, 4 jours et 8 jours; chez 3 autres, elle n'existait pas, et chez les deux derniers elle n'a pu être recherchée.

La température s'est élevée, dans les premiers jours, deux fois au-dessus de 39° et sept fois entre 38°,5 et 39° : vers le 5e ou 6e jour, elle oscillait au-dessus de 38° : assez souvent la descente se fait en lysis. Presque toujours la courbe du pouls est parallèle à celle de la température. La respiration est normale.

L'état général est assez sérieux; le plus souvent, les enfants arrivent dans un état d'abattement prononcé; ils ne mangent pas; cette inappétence paraît tenir à la douleur qu'ils éprouvent dans la gorge.

Parmi les complications de ces angines, nous devons signaler : deux fois la propagation aux fosses nasales, un phlegmon de l'amygdale, une stomatite et une conjonctivite. Ces angines sont vraisemblablement contagieuses. Deux frères, l'un de 7, l'autre de 9 ans, sont entrés à l'hôpital le même jour avec des angines, et l'examen bactériologique répété plusieurs fois n'a décelé que le streptocoque sans bacille de Lœffler. Sur le sérum, après 24 heures, il y avait de nombreuses colonies punctiformes, formées par des chaînettes courtes pour la plupart, mais dans le liquide du fond des tubes il en existait de plus longues.

Dans 2 observations, après 48 heures, nous avons vu apparaître d'assez nombreuses colonies de staphylocoques au milieu des colonies de streptocoques.

En résumé, ces angines se présentent comme des angines graves rappelant dans les premiers jours une angine diphtérique très sérieuse; elles s'améliorent rapidement et guérissent dans l'espace de 8 ou 10 jours.

Avant de terminer, nous tenons à rappeler en peu de mots l'observation du n° 14, dans laquelle nous relevons des douleurs dans les membres, des plaques érythémateuses au niveau des coudes, de la conjonctivite purulente, de l'albumine en notable quantité, une température au-dessus de 39° pendant plus de 8 jours; un pouls entre 160 et 170 pendant le même temps; un état général des plus mauvais. Cet enfant, malgré toutes ces complications, a très bien guéri.

Si nous résumons l'étude de toutes ces angines, nous voyons que nous avons pu réunir :

11 cas d'angine à coccus,
1 cas d'angine à pneumocoques,
4 cas d'angine à staphylocoques,
2 cas d'angine à bacilles coliformes,
11 cas d'angine à streptocoques,

soit 29 angines blanches non diphtériques.

Toutes ces angines ont guéri. Six fois elles se sont accompagnées de troubles laryngés, plusieurs fois de coryza, et par conséquent de jetage; l'albuminurie est constatée dans plus du tiers des cas. Ces angines non diphtériques ont donc provoqué des complications qui étaient regardées autrefois comme appartenant en propre à l'angine diphtérique vraie. Ce qui nous permet de conclure que non seulement l'examen bactériologique seul peut donner un diagnostic certain, mais encore qu'il est indispensable pour porter le vrai pronostic.

ANGINES DIPHTÉRIQUES

Pour les angines diphtériques, nous conserverons la division en angines pures et en angines à associations.

Angines diphtériques pures. — Sur 44 angines diphtériques pures, 34 ont guéri; les 10 autres ont succombé.

En étudiant ces angines pures, nous trouvons deux variétés essentiellement différentes.

Le premier groupe comprend 30 angines bénignes, que l'on n'aurait point reconnues comme diphtériques sans l'examen bactériologique.

Les autres au contraire sont cliniquement diphtériques : elles présentent au début une marche inquiétante, s'améliorent, et guérissent quelquefois ; mais le plus souvent les malades succombent.

Angines diphtériques bénignes (30 cas). — Tous les malades conservent un bon état général. Leur visage n'est pas altéré ; le teint reste coloré ; l'appétit persiste.

Les fausses membranes sont, en général, peu étendues ; dans 8 observations, elles se présentent sous forme de points blancs qui siègent sur les amygdales et rappellent l'amygdalite folliculeuse ; ces points blancs enlevés peuvent se reproduire pendant plusieurs jours, ou disparaître rapidement.

Rappelons, à ce propos, que plusieurs auteurs ont rencontré des angines sans fausses membranes dans lesquelles ils ont trouvé le bacille diphtérique ; nous n'avons pas de semblables exemples, mais plusieurs fois, sans un examen minutieux et attentif, la fausse membrane aurait pu passer inaperçue.

Dans 15 observations, nous voyons les fausses membranes disposées sous formes de plaques blanches localisées aux amygdales. Dans les 7 autres cas, elles envahissent les piliers, la luette, ou le voile du palais. Les ganglions cervicaux sont toujours engorgés ; si les fausses membranes sont plus étendues d'un côté, les ganglions correspondants sont ordinairement plus volumineux. Cette inégalité de volume entre les ganglions des deux côtés est presque une règle ; il n'y a pas d'empâtement périganglionnaire. Au toucher, ces ganglions sont durs, mobiles, souvent multiples : ils roulent sous le doigt ; deux fois seulement nous avons observé de l'adénopathie des ganglions sous-maxillaires, et alors il y avait des lésions diphtériques des lèvres.

L'examen des urines fournit les renseignements suivants : chez 13 malades il n'y a jamais eu d'albumine ; chez 7 autres l'albumine a été précoce et a duré de 2 à 5 jours ; chez 7 autres l'albumine a été tardive, apparaissant du septième au onzième jour de la maladie, et durant 1, 2 ou 3 jours ; enfin, dans les

3 derniers cas, il y a eu à la fois albuminurie précoce et tardive, avec un intervalle de 5 jours dans 2 cas et 3 jours dans l'autre. Nous retiendrons surtout ce fait que malgré un examen attentif, répété tous les jours et pour tous les malades, l'albumine a manqué dans plus du tiers des cas.

Si nous étudions la température, nous voyons que 4 fois seulement elle atteint ou dépasse 39° pour devenir régulièrement descendante; 23 fois elle oscille entre 38° et 39° pour regagner la normale du quatrième au sixième jour; 3 fois elle ne dépasse pas 38°.

Les courbes du pouls, le plus souvent, suivent une marche parallèle aux courbes thermiques.

Les premiers jours le pouls bat entre 100 et 120 fois à la minute; chez les enfants au-dessous de 3 ans on peut compter 140 à 150 pulsations, mais ce chiffre baisse assez rapidement : il oscille alors entre 100 et 120, et ne retombe au chiffre habituel que quelques jours après la disparition complète des fausses membranes et 4 ou 5 jours après le retour de la température normale.

Dans plusieurs de nos observations, nous avons remarqué, du quatrième au sixième jour de la maladie, une chute brusque du pouls; avant la disparition des fausses membranes, le pouls baisse de 20 à 30 pulsations pour se relever les jours suivants; cette chute momentanée est d'un bon pronostic, on ne la retrouve pas dans les formes graves. Notons enfin que, dans la convalescence de ces angines, le pouls est quelquefois irrégulier.

Le rythme respiratoire n'est pas modifié : on compte de 20 à 30 respirations par minute.

Comme complication, nous avons observé 7 fois de la toux rauque, 2 fois de la stomatite, 1 fois du coryza.

Quand on ensemence les fausses membranes sur des tubes de sérum, on trouve sur le premier tube des colonies abondantes ; toutefois elles sont bien isolées, il est facile d'étudier leurs caractères; sur le deuxième tube, les colonies sont peu nombreuses.

Au microscope nous avons trouvé 3 fois seulement le bacille long, 3 fois le bacille court, et dans tous les autres cas (24) le bacille moyen, le plus souvent seul, quelquefois associé au long.

Angines graves. — Nous pouvons étudier sous ce titre 14 observations : 10 morts et 4 guérisons.

Les fausses membranes sont ordinairement blanc grisâtre, assez adhérentes, quelquefois sanguinolentes : elles recouvrent, sans intervalle de muqueuse saine, les amygdales et les parties voisines, tapissent souvent toute l'arrière-gorge. Trois fois cependant les fausses membranes se sont présentées sous forme de points blancs localisés aux amygdales seules, ou parsemés sur la muqueuse buccale.

Les ganglions cervicaux sont engorgés des deux côtés dans tous les cas; ils sont volumineux, mais ne sont pas empâtés ; nous trouvons des ganglions sous-maxilllaires chez un seul malade, qui a eu de la stomatite.

L'examen des urines, chaque fois qu'il a pu être fait, nous a montré de l'albumine; 3 fois il nous a été impossible d'avoir des urines à cause du très jeune âge des enfants. L'albuminurie a été toujours précoce, sauf une fois où elle est survenue au treizième jour de la maladie. La présence de cette albuminurie précoce a donc une assez grande valeur au point de vue du pronostic. Toutefois, il est important de remarquer qu'elle n'apparaît jamais avant le troisième ou quatrième jour de l'entrée des petits malades, probablement le cinquième jour de la maladie.

L'albuminurie persiste jusqu'à la mort, et, dans les cas qui ont guéri, elle a duré plus de dix jours.

Les traces de la température présentent des plateaux aux environs de 39° pendant 4 et 5 jours, pour devenir descendants, si la maladie incline vers la guérison : ils restent très élevés dans 7 des cas mortels; dans 3 autres cas fatals, le tracé s'élève une fois brusquement la veille de la mort, une fois il décrit des oscillations ascendantes pendant les trois jours qui précèdent la mort. Enfin, chez un enfant qui semblait devoir guérir, la température de 40° était tombée à 38°,2; mais elle remonta à 39°,2 le jour où survinrent des convulsions; à l'autopsie, on a trouvé de la pneumonie lobaire.

L'étude du pouls est très utile pour le pronostic : on peut dire qu'il est encore plus influencé par la maladie que la température; les oscillations du pouls suivent en général celles de la température, mais en les exagérant; l'accélération du pouls précède quelquefois l'accroissement de la température, le plus souvent il la suit.

La respiration est peu modifiée.

Dans toutes ces angines, l'état général est mauvais, le facies est pâle, les muqueuses sont parfois décolorées et présentent une teinte livide, l'enfant ne mange pas, il a fréquemment de la diarrhée. Enfin les complications ne sont pas rares; nous avons noté : une fois de la stomatite intense, plusieurs fois du coryza, une fois de la suppuration des ganglions, une fois de la pneumonie franche, deux fois de la broncho-pneumonie et cinq fois des troubles laryngés.

Les tubes de sérum ensemencés contiennent de nombreuses colonies, parfois confluentes sur le premier tube; 6 fois elles étaient formées par le long bacille enchevêtré, dans tous les autres cas par le bacille moyen, seul ou associé au précédent.

ANGINES DIPHTÉRIQUES A ASSOCIATIONS

Lorsqu'on examine une fausse membrane, on rencontre le bacille diphtérique toujours associé à d'autres microbes, mais ceux-ci ne poussent pas sur le sérum et, pour faire une étude complète des bactéries qui accompagnent le bacille de Lœffler, il faudrait, comme l'a montré M. Veillon, pratiquer des ensemencements sur des milieux variés et des isolements nombreux. Nous ne considérerons ici que les microbes qui poussent sur le sérum, et qui sont en nombre considérable à côté du bacille spécifique.

Ces angines à associations sont au nombre de 26.

Angines diphtériques avec streptocoque. — Nous étudierons tout d'abord les angines où le bacille diphtérique se trouve associé avec le streptocoque. Nous disons qu'il y a association avec le streptocoque toutes les fois qu'après 24 heures nous trouvons, sur les tubes de sérum, deux sortes de colonies bien distinctes; les unes, en général plus abondantes et nettement diphtériques, les autres beaucoup plus petites, présentant un fin pointillé entre les premières. A l'examen microscopique, les grosses colonies sont formées par des bacilles diphtériques, et les petites colonies par des cocci souvent isolés, ou se disposant par courtes chaînettes de 4 à 5 éléments.

Nous possédons 14 observations rentrant dans cette catégorie; 13 se sont terminées par la mort.

Dans 13 cas, les colonies formées par le bacille diphtérique

paraissent plus abondantes que celles du streptocoque; dans un cas, au contraire, les colonies de streptocoques sont de beaucoup les plus nombreuses. Dans 5 observations les colonies sont confluentes sur le premier tube: dans 8 autres, elles sont nombreuses, et enfin dans 1 cas nous avons noté de rares colonies sur le premier tube.

Au microscope, nous avons toujours trouvé le bacille diphtérique long, seul ou associé au moyen, et jamais le bacille court.

L'association du bacille diphtérique et du streptocoque donne des angines particulièrement graves, mortelles dans l'immense majorité des cas, et cependant les cultures de chacun des microbes, inoculées séparément, ne sont pas toujours très virulentes: 5 fois nous avons inoculé le bacille diphtérique à des cobayes, 2 fois il a amené la mort en 2 et 5 jours, 3 autres fois les animaux ont résisté.

Les enfants dont nous parlons entrent au pavillon pour de l'angine, mais il nous est difficile de bien décrire la marche de la maladie, attendu que 11 sur 14 sont morts le jour même ou le lendemain de leur entrée; le douzième est mort 7 jours après son entrée, le treizième, le vingt-deuxième jour de sa maladie; le quatorzième a guéri. A l'exception de ces 2 derniers cas que nous étudierons séparément, les 12 autres malades présentent presque identiquement les mêmes symptômes. Les fausses membranes sont épaisses, grisâtres, adhérentes, assez souvent sanguinolentes, tapissent les amygdales, les piliers, la luette, souvent toute l'arrière-gorge :

Les ganglions carotidiens sont volumineux, empâtés, douloureux; l'aspect proconsulaire était très manifeste dans 1 cas.

La recherche de l'albumine n'a été possible que chez trois enfants n'ayant pas succombé immédiatement; dans ces 3 cas et durant les 3 premiers jours après l'entrée à l'hôpital, absence complète d'albumine, dont l'apparition n'était constatée que le quatrième jour, selon toute probabilité le sixième ou septième de la maladie.

On voit que, dans ces angines graves, l'albuminurie ne pouvait fournir un élément de pronostic au début.

Si nous étudions la température, nous voyons que, dans tous les cas mortels, sauf un où elle n'a pu être prise qu'une fois et

marquait 38°,4, elle était au-dessus de 39°, et souvent plus près de 40°.

Le pouls suit les oscillations de la température et même les exagère ; ainsi nous trouvons, par exemple, de 160 à 180 pulsations, et dans le cas où la température était de 38°,4 nous avons pu compter 156 pulsations.

Ce pouls rapide ne manque jamais dans les cas graves. Par contre, les troubles de la respiration sont peu importants; la respiration reste calme et modérée dans 10 observations ; elle s'accélère, au contraire, dans 3 autres cas où il y a eu 2 fois de la bronchopneumonie, et 1 fois un début de croup.

Parmi les complications de ces angines, nous devons noter 4 fois le coryza avec jetage purulent et sanieux, 2 fois la broncho-pneumonie, 1 fois le croup, 1 fois la suppuration des ganglions. Le plus grand nombre de ces enfants avaient de la diarrhée.

Si nous récapitulons tous ces symptômes, nous voyons que l'angine à association avec le streptocoque se présente avec les symptômes caractéristiques des angines malignes, et tous nos malades s'offraient à nous avec le facies pâle, les lèvres violacées, les yeux éteints, abattus, l'haleine fétide, et dans un état de torpeur qui faisait présager une mort prochaine.

Dans les 2 cas qui diffèrent des précédents, un des enfants meurt au vingt-deuxième jour de sa maladie après avoir présenté au début des symptômes de croup qui s'étaient améliorés ; il a eu du coryza avec épistaxis répétées, enfin de la suppuration ganglionnaire. A partir du huitième jour jusqu'à la mort, on a trouvé de l'albumine en quantité notable : la température est toujours restée dans le voisinage de 39°, le pouls a suivi la marche de la température, et la respiration n'a pas dépassé 35 par minute. Cet enfant a succombé à toutes ces complications.

Notons, comme particularité bactériologique, qu'en outre du bacille diphtérique et du streptocoque, il existait du staphylocoque.

La dernière observation que nous désirons mentionner est celle d'un enfant de 2 ans 1/2, entré au deuxième jour de sa maladie. Sur les tubes de sérum on a trouvé : sur le premier tube, 8 colonies diphtériques, 6 seulement sur le second, et en plus de nombreux streptocoques.

Cette angine s'est présentée avec tous les caractères d'une angine bénigne : les fausses membranes étaient assez étendues, il est vrai, mais l'état général est resté bon et la température n'a jamais dépassé 38°. C'est le seul cas de guérison que nous possédions parmi ces 14 angines à association avec streptocoques.

Angines diphtériques à staphylocoque. — Dans 5 observations, la bactérie associée dominante était le staphylocoque blanc. Deux de ces observations sont absolument comparables aux angines malignes déjà décrites ; toute l'arrière-gorge est tapissée par un enduit pultacé; les ganglions sont engorgés et tuméfiés; le cou prend l'aspect proconsulaire; il existe de l'albumine, et la température est ascendante dans les régions élevées; les 2 enfants meurent le troisième jour de leur entrée avec des températures au-dessus de 40°.

Les 3 autres observations se présentent d'abord comme des angines sérieuses : fausses membranes peu étendues, ganglions multiples assez volumineux, albumine dans les urines, température à oscillations descendantes. Toutefois la guérison paraissait probable, mais du quatrième au sixième jour la maladie change d'allures et se complique 2 fois de broncho-pneumonie, et l'autre fois de myocardite, caractérisée par une chute brusque du pouls qui de 120 tombe à 60.

Tous ces enfants sont morts.

Angines diphtériques à associations variées. — Reste à étudier 7 angines à associations. Dans 6 cas le bacille diphtérique se trouve associé au petit coccus déjà décrit. Dans le septième il est associé à un streptocoque à gros grains dont les colonies sont bien développées et ne ressemblent pas au petit semis des colonies du streptocoque rencontré habituellement. Nous avons cru devoir joindre ce cas aux autres, car sa description clinique leur est identique. Dans un des 6 premiers cas, en outre du petit coccus, il y avait du staphylocoque blanc. 3 fois les colonies diphtériques sont nombreuses sur le premier tube, et formées par le bacille long, 3 fois elles sont nombreuses et formées par le bacille moyen, 1 fois elles sont peu nombreuses et formées par le bacille moyen et court.

Au point de vue clinique, ces angines ne méritent pas de description particulière; elles ressemblent aux angines diphtériques bénignes; notons toutefois que leur durée est un peu plus longue :

que l'albumine se rencontre 5 fois sur 7; qu'elle dure souvent très longtemps, 4, 6, 11, 17 et 22 jours.

La température est peu élevée, l'état général est le plus souvent satisfaisant. Faisons remarquer en terminant que, pour l'angine où le coccus et le staphylocoque se trouvent réunis, la maladie a été beaucoup plus longue et plus sérieuse.

Si nous prenons l'ensemble des angines où le bacille diphtérique se trouve associé à d'autres microbes, nous voyons que sur 26 cas nous avons 8 guérisons et 18 décès. Tous ces décès proviennent d'angines diphtériques, avec association de streptocoque et de staphylocoque.

CROUPS

Croups non diphtériques	7	Morts	1
Croups non diphtériques au début devenus diphtériques par contagion	7	Morts	3
Croups diphtériques	85	Morts	55

Les croups que nous avons observés sont au nombre de 99 : nous les diviserons, comme les angines, en croups non diphtériques et croups diphtériques. Les premiers sont relativement peu nombreux, mais il est très important de savoir les reconnaître. Eux aussi nécessitent la trachéotomie; bien traités ils guérissent presque sûrement; méconnus et gardés dans les salles de diphtérie, ils deviennent rapidement graves. Il est rare qu'un enfant entré au pavillon pour une angine non diphtérique soit contaminé: il est fréquent, au contraire, de voir des enfants trachéotomisés pour une laryngite non diphtérique prendre le croup vrai avec bacilles de Klebs-Lœffler s'ils séjournent quelque temps dans les salles. Alors, l'état s'aggrave et la mort est le plus souvent la conséquence d'un faux diagnostic. La porte d'entrée de l'infection secondaire dans ce cas est toujours la plaie trachéale. De nombreux examens bactériologiques, et quelques autopsies ne nous laissent aucun doute à cet égard. La contamination se fait même si rapidement que si l'examen bactériologique n'a pas été pratiqué dès le premier jour, elle devient très difficile à établir.

Dans ce chapitre, nous classerons les croups comme cela a déjà été fait par l'un de nous dans un précédent travail.

C'est-à-dire que nous les diviserons en croups avec angine et en croups sans angine, la difficulté du diagnostic n'étant pas comparable dans les deux cas.

Chaque fois que l'on se trouve en face d'un petit malade ayant la toux rauque, la voix éteinte et quelquefois du tirage, on demande à l'examen de la gorge le complément du diagnostic. Quand on ne trouve pas de fausses membranes, plusieurs hypothèses se présentent à l'esprit, et le diagnostic reste indécis, si l'on n'a pas recours à l'examen bactériologique, qui peut seul lever la difficulté.

Dans les cas de ce genre, avec la spatule de platine il faut puiser du mucus dans le pharynx, le plus près possible du larynx, en abaissant fortement la base de la langue. On ensemence sur sérum et, moins de 24 heures après, on est fixé sur la nature, diphtérique ou non, de la laryngite. Si l'on a affaire à un croup diphtérique, les colonies du bacille spécifique seront évidentes sur les tubes, qu'elles soient seules ou associées à d'autres bactéries. Elles feront complètement défaut dans les croups non diphtériques. Pour que le renseignement donné par la culture sur sérum ait toute sa valeur, il ne suffit pas de faire la prise de semence en grattant la surface des amygdales, il faut puiser dans le pharynx aussi bas que possible. Nous nous sommes assurés que, dans certains cas, le mucus des amygdales ne donnait aucune colonie diphtérique, tandis que celui pris profondément dans le pharynx ou même dans le larynx en fournissait de nombreuses.

Nous avons recueilli 28 observations de laryngite sans fausses membranes dans la gorge : 7 ne sont pas diphtériques, 21 sont diphtériques, dont 16 diphtériques pures et 5 avec associations.

CROUPS NON DIPHTÉRIQUES

Croups non diphtériques sans angine (7 cas, 1 décès). — Ces croups, au nombre de 7, étaient causés trois fois par le petit coccus en diplocoque, trois fois par des staphylocoques blanc ou doré, et une fois par du staphylocoque blanc associé au streptocoque; les 6 premiers ont guéri, le dernier a abouti à la mort.

Trois de ces malades ont été pris brusquement, les autres lentement. Dans les 6 cas guéris, l'aspect général des enfants est

resté satisfaisant, le visage est rosé et l'appétit conservé. Les ganglions cervicaux sont peu volumineux. Une seule fois, il y avait de l'albumine dans l'urine, à la fin de la maladie.

Cependant, chez trois enfants, la température est montée à 39°,5, puis est descendue en faisant des oscillations; chez trois autres elle a été peu au-dessus de la normale.

Le pouls est bon, le nombre des pulsations ne dépasse pas 140, et il redevient normal par une chute brusque. La respiration est légèrement accélérée pendant la période d'état de la maladie.

Ces petits enfants arrivent avec de la toux rauque, une voix éteinte, une respiration parfois gênée, mais sans véritable tirage. La gorge est simplement un peu rouge, sans fausse membrane aucune. Aucun n'a été trachéotomisé.

Le septième enfant, qui a succombé après la trachéotomie, a fourni un tracé de température en forme de plateau élevé.

A l'autopsie, nous voyons un phlegmon du cou, entourant la partie moyenne de la trachée, avec des foyers de broncho-pneumonie suppurée. Ces lésions confirmaient absolument le diagnostic bactériologique.

Croups avec angines non diphtériques au début (7 cas, 3 décès). — Nous devons parler maintenant de 7 observations de croups avec angine où les premiers ensemencements n'ont pas donné de colonies diphtériques, tandis que ceux qui ont été faits plus tard en ont montré, comme s'il y avait eu une contamination dans les salles. Nous résumons, comme exemple, l'observation de Hélène D..., enfant de 7 ans, amenée le 19 décembre avec des fausses membranes dans la gorge et opérée immédiatement. Les mucosités épaisses, rejetées par la plaie trachéale, sont ensemencées sur sérum, il ne pousse que des colonies de coccus.

Le 22 décembre, l'ensemencement des fausses membranes prises soit dans la gorge, soit dans la trachée, ne donnait encore aucune colonie diphtérique, mais des coccus. Le 26 décembre, les fausses membranes de la gorge avaient disparu et le mucus du pharynx ne fournissait aucune colonie diphtérique. Le même jour, une prise faite dans la canule donna sur sérum quelques rares colonies diphtériques. Le 30 décembre, le mucus du pharynx contenait des bacilles diphtériques nombreux. Il s'agit donc bien ici d'un croup non diphtérique, puisqu'au moment de l'opération il n'y a de bacilles ni dans la gorge, ni dans la trachée,

et que ceux-ci n'apparaissent que plus tard, apportés sans doute dans la plaie trachéale, puisqu'ils apparaissent d'abord dans la trachée et ne s'étendent que plus tard au larynx.

Nous avons alors pensé que le lavage à l'eau bouillante que l'on faisait subir aux canules n'était peut-être pas suffisant à les désinfecter, surtout quand des mucosités se sont desséchées à l'union du pavillon avec le tube. En lavant les canules en ces points avec de l'eau stérile, puis en ensemençant sur sérum, nous avons obtenu quelquefois des colonies diphtériques, ce qui explique les cas comme celui que nous venons de parler, et fait voir en même temps qu'un bacille, sans spores, fragile comme celui de la diphtérie, peut résister à l'action passagère de l'eau bouillante, s'il est protégé par des couches albumineuses séchées. Il faut toujours avoir bien soin de laisser s'imbiber ces mucosités desséchées, et de chauffer à 100° ou mieux à 115° assez longtemps pour que la sécurité soit parfaite.

Six autres observations, sans être aussi probantes que celle que nous venons de résumer, se rapportent à des enfants atteints de croup, avec ou sans fausses membranes dans la gorge, et qui ont été trachéotomisés. Les ensemencements étaient faits de deux en deux jours : les premiers ne donnaient pas de bacilles diphtériques, les autres en montraient d'abord dans la trachée et en petit nombre, puis de plus en plus nombreux qui s'étendaient au pharynx. Dans un cas, on trouvait à l'autopsie une fausse membrane développée au pourtour de la plaie trachéale, tandis que le larynx et le pharynx étaient déjà libres. La fausse membrane laissait voir au microscope des bacilles spécifiques avec de nombreux coccus ; dans le poumon il y avait des bacilles diphtériques renflés à leurs extrémités, et aussi un coccus disposé en diplocoque ou en courtes chaînettes de 4 articles.

Chez ceux de ces enfants qui ont guéri, les colonies diphtériques sont restées rares.

CROUPS DIPHTÉRIQUES

1° *Croups avec angine* (*diphtérie pure*). — L'ensemencement sur sérum donne un grand nombre de colonies du bacille de Löffler avec très peu ou point d'autres bactéries. 33 enfants sont compris dans cette catégorie, 26 sont morts, 7 ont guéri.

Laissons de côté trois d'entre eux qui étaient mourants au moment de leur entrée à l'hôpital, et dans un état général si fâcheux que la trachéotomie n'a pas été tentée. Il reste donc 30 enfants qui ont subi l'opération et qui ont fourni 23 décès.

Cas mortels (23). — L'ensemencement sur sérum de tous ces cas mortels a donné dans les deux tubes de nombreuses colonies diphtériques; 16 fois, elles étaient formées par des bacilles longs enchevêtrés, six fois par des bacilles moyens, et une fois par des bacilles courts disposés parallèlement.

Le plus souvent, l'angine avait précédé les symptômes laryngés et, à l'examen de la gorge, on voyait, à l'entrée à l'hôpital, soit de larges fausses membranes recouvrant les deux amygdales, la luette et quelquefois les piliers du voile du palais; soit de larges traînées verticales sur les piliers et le pharynx, séparées par des intervalles de muqueuse saine et plongeant dans l'arrière-gorge; chez 7 malades il y avait de simples plaques blanches peu étendues, mais très adhérentes.

Les ganglions cervicaux étaient en général volumineux, multiples, non douloureux, point empâtés et surtout engorgés du côté où prédominaient les fausses membranes. Deux enfants ont eu du jetage nasal, deux autres de la diphtérie cutanée, et un cinquième des fausses membranes sur les lèvres,

La plupart de ces petits malades sont arrivés en état d'asphyxie très prononcée et ont été opérés aussitôt. Quelques-uns même ont été amenés si tard qu'ils ont succombé quelques heures après l'opération.

La température oscillait entre 39° et 40°: quelquefois le tracé formait un plateau, mais le plus souvent il était ascendant et dépassait 40° au moment de la mort.

Le pouls, toujours très fréquent (120-170), présentait des oscillations parfois considérables et irrégulières.

La respiration est toujours accélérée : on compte de 30 à 50 inspirations par minute, s'il n'y a pas de complications pulmonaires; dès que les poumons se congestionnent ou qu'ils sont envahis par la broncho-pneumonie, le nombre des inspirations atteint et dépasse soixante. Cette fréquence suffit à elle seule pour affirmer la broncho-pneumonie. D'après M. Jules Simon, on peut déclarer qu'elle existe lorsque la respiration est de 60 par minute : il est inutile d'avoir recours à l'auscul-

tation, qui est d'ailleurs rendue très difficile par les bruits qui se passent dans la trachée des enfants opérés.

Les urines renferment presque toujours beaucoup d'albumine, ou du moins une quantité notable. L'albuminurie persiste pendant toute la durée de la maladie, et va parfois en augmentant: cependant elle manquait chez deux enfants qui moururent en moins de 4 jours après le début de l'angine. Dans ces cas très rapides, elle n'a pas eu le temps de s'établir.

La survie après l'opération est en moyenne de trois à cinq jours, mais parfois de deux jours seulement, et rarement de sept jours. Exceptionnellement la maladie a duré dix-huit jours et même vingt-et-un jours. Dans ce dernier cas, il s'agissait d'un enfant très vigoureux, venu avec une angine peu grave en apparence, causée par du bacille diphtérique moyen, qui s'étendit au larynx et nécessita la trachéotomie. A la suite de l'opération, une broncho-pneumonie fit mourir le malade. La broncho-pneumonie est en effet une complication des plus redoutables, malheureusement trop fréquente après la trachéotomie; plus du tiers des enfants qui ont succombé avaient de la broncho-pneumonie.

A l'autopsie, nous avons fréquemment trouvé des fausses membranes tapissant le larynx et descendant dans la trachée jusqu'aux ramifications bronchiques. D'autres fois, les pseudo-membranes étaient très peu étendues au voisinage des cordes vocales, mais causées par un bacille virulent: elles faisaient périr les enfants par empoisonnement, car il y a des croups toxiques comme des angines toxiques. A côté de ces lésions, il faut signaler des foyers de broncho-pneumonie en suppuration. L'existence de la broncho-pneunomie est la règle lorsque la maladie s'est un peu prolongée. D'autres fois les poumons sont le siège d'une congestion intense; il suffit de puiser avec un fil de platine dans les points congestionnés et d'ensemencer sur sérum, pour obtenir de nombreuses colonies diphtériques. Dans les foyers de broncho-pneumonie, on trouve aussi des bacilles spécifiques associés à d'autres bactéries.

Deux malades eurent des convulsions avant la mort: l'un d'eux (nº 106), avait la respiration et le pouls très fréquents alors que la température baissait un peu. L'albuminurie était abondante. L'autopsie montra une bronchite pseudo-membraneuse, malgré que les ensemencements, faits à l'entrée, aient fourni un

bacille peu virulent. Cet enfant était resté six jours dans les salles; peut-être y a-t-il rencontré des bacilles actifs qui ont causé l'extension de la maladie.

Cas guéris. — Sept enfants atteints de croup diphérique avec angine et trachéotomisés ont guéri ; le tableau clinique présenté par eux est bien différent de celui que nous venons de décrire. Le visage reste rosé, l'attitude n'est pas abattue, les fausses membranes sont rarement très étendues: le plus souvent elles forment des plaques grisâtres adhérentes, de la largeur d'une lentille, et siégeant au niveau des cryptes de l'amygdale. Les ganglions sont petits, point douloureux, nullement tuméfiés; parfois il n'y a qu'un ganglion tuméfié et d'un seul côté.

L'ensemencement sur sérum donne des colonies bien séparées, faciles à compter, même sur le premier tube: elles font quelquefois défaut sur le second tube. Ce ne sont plus les colonies serrées, innombrables, que l'on obtient dans les cas mortels. Dans la grande majorité des cas, elles sont formées par des bacilles de longueur moyenne, une seule fois nous avons trouvé des bacilles longs enchevêtrés et deux fois des bacilles courts.

La température dépasse rarement 39° au début et n'atteint jamais 40°. Après l'opération, elle commence à descendre régulièrement, ou subit pendant 2 ou 3 jours des oscillations pour décroître ensuite. Chez un malade que nous avons observé, 4 jours avant la trachéotomie, le tracé de la température avait une marche graduellement ascendante jusqu'au moment de l'opération. Il resta ensuite 2 jours à la hauteur de 39°, puis s'inclina vers la température normale. Chaque fois qu'il y a une ascension de la température, on peut être certain que les fausses membranes s'étendent ou qu'il survient quelque complication. Seuls, certains troubles du côté du cœur et des reins font exception à cette règle.

Le pouls bat, au début, de 110 à 150 fois par minute; il décroît avec la température, mais ne revient à la normale que longtemps après que la convalescence est établie. Ainsi, nous avons compté 110 et 120 pulsations par minute et noté des irrégularités chez des enfants dont la guérison paraissait complète. Toutes les complications qui influent sur la température retentissent sur le pouls et d'une façon plus marquée encore.

La respiration, pénible avant l'opération, s'améliore quand

celle-ci est faite, cependant elle reste longtemps accélérée (de 25 à 35 par minute).

L'albuminurie ne manque jamais, elle est même assez forte dans les cas bénins, mais elle n'apparaît que tardivement; elle a été constatée, chez l'enfant L... Eug. âgé de quatre ans, le onzième jour seulement après l'opération, 5 jours après l'ablation de la canule. Elle peut même disparaître momentanément pour revenir ensuite.

Sur aucun de ces petits malades, qui ont guéri, la dipthérie ne s'est étendue ni à la peau ni aux fosses nasales. Il n'y a pas eu non plus de complications pulmonaires.

2° *Croups avec angine* (*diphtérie à associations*). — Les microbes étrangers trouvés le plus souvent ont été le petit coccus en diplocoque, dont nous avons déjà parlé, le streptocoque et enfin le staphylocoque; nos observations sont au nombre de 31.

Croup dipthérique avec petit coccus. — Dix observations avec trachéotomie; 4 morts et 6 guérisons. Dans les cas terminés par la mort, l'ensemencement sur sérum donne de nombreuses colonies diphtériques et de rares colonies de coccus; de sorte que l'aspect des tubes ressemble beaucoup à celui que l'on observe dans les cas de diphtérie pure.

Au microscope, on trouve trois fois le long bacille diphtérique et une fois le moyen.

Chez ces malades, les fausses membranes, blanches, épaisses, recouvraient les deux amygdales, et une fois même s'étendaient aux deux piliers postérieurs.

Les ganglions sont volumineux, mais isolés, dans trois cas, un peu empâtés dans le quatrième.

L'albumine existait en quantité notable dans l'urine de trois enfants. Celle du quatrième enfant n'a pu être recueilli à cause de son jeune âge (17 mois).

Le tracé de la température est élevé et ascendant dans trois cas, en plateau dans le quatrième.

Les variations du pouls et de la respiration suivent celles de la température.

Parmi les complications, signalons une fois du jetage, une fois de la broncho-pneumonie; trois de ces enfants sont morts le lendemain de leur entrée, le quatrième a vécu 7 jours après la trachéotomie. Pendant 3 jours, les courbes de la température, du

pouls, de la respiration ont décrit des oscillations descendantes, mais au cinquième jour toutes les courbes montèrent, et l'enfant mourut de broncho-pneumonie.

Les 6 croups qui se sont terminés favorablement ont donné à l'ensemencement sur sérum des colonies diphtériques, nombreuses dans cinq cas et rares dans un cas. Les colonies de coccus étaient toujours abondantes, souvent plus nombreuses que les colonies diphtériques.

Au microscope on ne trouve qu'une fois le bacille moyen.

L'angine est peu prononcée ; dans trois cas on trouve des points blancs, deux fois de minces plaques sur les deux amygdales, et, dans le dernier, une fausse membrane blanche, jaunâtre, épaisse, sur les deux amygdales.

Les ganglions sont isolés et petits dans cinq cas ; une fois isolés et assez volumineux.

L'albuminurie a été précoce et notable dans trois observations, avec une durée de 8 à 10 jours, précoce et tardive dans les trois autres. L'intervalle entre les deux poussées d'albuminurie était, comme pour les angines, de 5 à 6 jours.

La température dans quatre cas est régulièrement descendante ; dans deux observations elle est élevée, puis baisse légèrement pour remonter ensuite. Cette ascension de la température coïncide avec une élévation des courbes du pouls et de la respiration ; en même temps l'auscultation révèle des symptômes de broncho-pneumonie. Cette complication terminée, les courbes décrivent, comme dans les autres cas, des courbes régulièrement descendantes.

Ces enfants sont restés au pavillon pendant 15 à 20 jours en moyenne.

Si nous reprenons ces 10 croups, nous voyons que les meilleurs éléments de pronostic sont en première ligne : l'examen bactériologique, puis l'étendue et l'aspect des fausses membranes, et enfin les courbes de la température, du pouls et de la respiration.

En résumé, comme pour les angines, cette association du bacille diphtérique avec le petit coccus, reste une association bénigne.

Croups diphtériques avec streptocoque. — 16 observations, 4 guérisons et 12 décès.

Les 4 cas, terminés par la guérison, présentent un tableau tout à fait différent des autres.

L'ensemencement donne peu de colonies diphtériques, formées par du bacille court, et une seule fois par le bacille moyen. Les colonies de streptocoque ne sont pas non plus très nombreuses.

Au point de vue clinique, ces enfants ont eu une diphtérie bénigne.

Cependant, au début, la température oscillait entre 39 et 40°, et les urines ont toujours été albumineuses. Ces malades sont restés 15 jours environ au pavillon; leur état général était bon, et chez eux il n'est survenu aucune complication.

Dans les 12 observations terminées par la mort, on a noté sur les tubes de sérum des colonies nombreuses de bacille diphtérique, séparées par un abondant pointillé de colonies de streptocoques.

Au microscope, on constate 10 fois le bacille long, 2 fois le bacille moyen. Dans 2 observations, en outre du streptocoque, on signale des colonies d'un diplobacille très court, qui se dispose aussi en chaînettes et se colore par la méthode de Gram. Sa présence coïncidait toujours avec un écoulement sanieux, sanguinolent, par la canule. Nous dirons de plus que ce microbe paraît très contagieux ; quand il se montre chez un enfant, ses voisins immédiats meurent le plus souvent dans un délai très rapide en présentant des symptômes d'infection suraiguë.

Deux autres malades ont fourni quelques colonies de staphycoloques, et une fois le petit coccus en diplocoque se surajoutant au streptocoque et au bacille diphtérique.

Dans ces croups où le streptocoque est associé au bacille diphtérique, l'angine est encore dans toute son intensité lorsqu'apparaissent les troubles laryngés. Nous l'avons déjà décrite ailleurs : répétons seulement que les fausses membranes sont grisâtres, sanieuses, fréquemment sanguinolentes, qu'elles tapissent souvent toute l'arrière-gorge, sans intervalle de muqueuse saine.

Les ganglions sont gros, presque toujours très empâtés, parfois très douloureux et donnent au cou l'aspect proconsulaire.

L'albumine n'a pu être recherchée dans 4 cas. Dans 6, on l'a trouvée le plus souvent en grande quantité. Dans 2 cas, elle n'existait pas.

La température est toujours très élevée. 3 fois le tracé se maintient en plateau entre 39° et 40°; 7 fois, il présente le type régulièrement ascendant; d'abord descendant, il devient dans 1 cas rapidement ascendant, et l'enfant meurt de broncho-pneumonie. Dans un autre cas, toutes les courbes sont régulièrement descendantes, l'enfant paraît en bon état : on lui retire sa canule 11 jours après l'opération. Tout faisait prévoir la guérison, à l'exception, toutefois, de l'albumine qui persistait en notable quantité depuis huit jours; l'enfant mourut de convulsions le lendemain du jour où l'on retira sa canule. Le pouls battait de 140 à 160 pulsations par minute et était incomptable au moment de la mort. La respiration, également très fréquente, présentait une accélération finale comme le pouls.

L'état général de ces enfants est ordinairement mauvais. Ils sont pâles, avec des lèvres quelquefois violacées. Leur haleine est fétide, ils ont de la diarrhée; l'un d'eux avait du coryza avec jetage.

La durée du séjour à l'hôpital est de 2 à 3 jours dans 8 cas, de 5 jours dans 8 cas, de 11 jours dans le dernier.

Croups avec angines (diphtérie et staphylocoque). — 5 observations avec trachéotomie : 2 guérisons et 3 décès.

Les 2 malades qui ont guéri ont fourni un bacille diphtérique court. Pour l'un d'eux, la maladie fut particulièrement bénigne. La température n'a jamais dépassé 38°,5; le pouls, 135 et la respiration 35 par minute. L'autre cas fut beaucoup plus grave. La température, pendant 8 jours, monta au-dessus de 39°, le pouls battait entre 110 et 140, la respiration entre 40 et 50. Cet enfant finit cependant par guérir, malgré une légère rechute vers le vingtième jour. Comme dans les cas graves, pendant longtemps on constata de l'albumine en quantité notable ou en grande quantité.

Voici le résumé des 3 autres observations terminées par la mort.

Le nommé L. (Georges), 2 ans 1/2, fut amené asphyxiant et opéré immédiatement; il avait une angine caractérisée par de larges plaques très blanches et très adhérentes

sur les amygdales; le pouls était à 180, la température oscillait entre 39° et 40°. Dans l'urine, on trouvait beaucoup d'albumine. L'ensemencement des tubes avait donné du bacille moyen et du staphylocoque.

J. (Louise), 4 ans 1/2, avait une angine avec croup présentant les mêmes caractères que dans le cas précédent; la température, assez élevée (39°) au début, prit une marche décroissante ainsi que la respiration et le pouls; seuls ces derniers firent une ascension brusque le jour de la mort, qui arriva le onzième jour. L'albumine avait toujours existé en grande quantité.

A l'autopsie, on trouva une péricardite avec épanchement, et des foyers de broncho-pneumonie suppurée dans les 2 poumons.

L'ensemencement des tubes de sérum le premier jour avait donné du staphylocoque et du court bacille diphtérique.

R. (Germ.), 2 ans 1/2, est amenée le 14 octobre, pour une angine à fausses membranes très étendues : elle fut opérée immédiatement. La température était de 39°, elle monta rapidement jusqu'à la mort, qui survint le 16.

Les fausses membranes de la gorge contenaient surtout du staphylocoque et des bacilles diphtériques en petit nombre. Celles rendues par la canule étaient riches en bacilles spécifiques. Ceux-ci furent aussi trouvés dans le poumon à l'autopsie.

Croups diphtériques sans angines (*diphtérie pure*). Nous possédons 16 observations de croups diphtériques purs sans fausses membranes apparentes dans la gorge pendant tout le temps de la maladie; 6 se terminent par la mort et 10 par la guérison.

Cas mortels. — Les tubes ensemencés donnent naissance à de nombreuses colonies formées par du long bacille diphtérique (2 fois) et par le bacille moyen (2 fois).

Ces 4 malades ont été opérés. Après l'opération, leur température reste très élevée, le pouls et la respiration sont rapides, il existe toujours de l'albumine dans les urines, et les enfants meurent le deuxième ou le troisième jour après la trachéotomie.

Dans les deux autres cas suivis de mort, les troubles laryngés ne sont survenus que 15 jours environ après le début d'une bronchite simple en apparence; nous avons pu suivre l'un pendant toute sa durée.

B. Georges, 2 ans 1/2, entré le 12 décembre 1892 pour une

inflammation légère des fosses nasales du pharynx et de la trachée. Au bout de quelques jours il paraît guéri quand, le 13 et 14 décembre, il devient plus malade avec une température de 40°. L'état s'améliore le 20 décembre, et le 21 il a 38°5 de température, mais le 22 on trouve 39°2 le matin et 40°5 le soir. Il n'y a de fausses membranes à aucun moment. La voix qui avait été normale jusqu'à ce jour est un peu voilée : immédiatement on ensemence deux tubes de sérum avec du mucus pris dans le pharynx; le 23, l'examen bactériologique nous montre du bacille diphtérique. L'enfant est envoyé au pavillon Trousseau où il est trachéotomisé et meurt 4 jours après.

Cas guéris. — 5 sont bénins et évoluent sans opération comme les diphtéries légères : les 5 autres sont plus graves et nécessitent la trachéotomie. Ces derniers présentent tous le même tracé de la température : pendant 2 ou 3 jours, un plateau avec oscillations autour de 39°, puis une décroissance régulière en lysis; le pouls, rapide, reste souvent à 120 après la guérison complète; la respiration est accélérée, enfin l'albuminurie persiste pendant toute la maladie, elle est assez intense et souvent elle est intermittente. Ces enfants ont un bon faciès et la guérison vient graduellement sans complications.

Les croups diphtériques qui guérissent donnent en général à l'ensemencement des colonies peu abondantes et d'autant moins nombreuses que le cas est plus bénin.

Une fois nous avons trouvé le long bacille diphtérique (il n'y avait que 4 colonies); 2 fois le moyen, 4 fois le court, et, dans les 3 derniers cas, les bacilles courts et moyens réunis.

Croups sans angine (*diphtérie avec association*). — Nous avons 5 cas très graves ayant nécessité l'opération : un seul a guéri. Il montrait à l'examen bactériologique quelques rares bacilles diphtériques courts, associés à des streptocoques et des staphylocoques nombreux. Les 4 cas mortels nous ont donné du bacille diphtérique associé à des streptocoques. Au point de vue du facies, de la température, du pouls et de l'albuminurie, ils se sont comportés comme les angines à streptocoques : deux fois la broncho-pneumonie vint avancer la mort. Nous ferons remarquer en passant combien cette dernière complication est plus rare dans les croups diphtériques purs que dans les croups avec associations microbiennes.

Si nous réunissons les différents chiffres cités dans ce mémoire nous pourrons établir le tableau suivant :

Angines non diphtériques		29	Mortalité.	0
— diphtériques		70	—	40 °/o
Croups non diphtériques	non opérés	6	—	0
	opérés[1]	8	—	50 °/o
Croups diphtériques	non opérés	8	—	37 °/o
	opérés	80	—	67 °/o

Dans ce travail, nous avons été obligés à bien des répétitions pour montrer que la bactériologie et la clinique sont toujours d'accord, et qu'à chaque maladie définie bactériologiquement correspond un ensemble de caractères cliniques. Notre conclusion sera que l'ordre commence enfin à s'introduire dans l'histoire jusqu'ici confuse des angines et des croups. Il faut reconnaître que c'est à la bactériologie que nous devons ce progrès. C'est elle qui, en apportant la notion de cause dans leur étude, y a introduit une précision qui permet d'essayer un classement. Grâce à l'ensemencement sur sérum, nous savons aujourd'hui reconnaître la diphtérie dans toutes ses manifestations ; il y a diphtérie, quels que soient les symptômes, chaque fois que cet ensemencement donne des colonies du bacille de Klebs-Löffler. La sécurité et la simplicité de la technique justifie une telle assertion. En s'appuyant sur cette base solide, on doit faire deux grandes divisions dans les angines et les croups, à savoir : ceux qui sont diphtériques et ceux qui ne le sont pas. Les premiers, à cause de leur gravité, ont attiré l'effort des travailleurs, ce sont les mieux connus ; il n'est pas douteux que les seconds seront éclaircis à leur tour. La bactériologie impose encore de diviser les croups et les angines diphtériques en *purs* et en *associés*.

En général, on peut porter un pronostic précoce, rarement infirmé, en tenant compte de l'ensemble des éléments fournis par la bactériologie et par la clinique. Quand il s'agit de diphtérie pure, le nombre des colonies développées sur le sérum, l'aspect long ou court des bacilles, leur virulence, représentent les données bactériologiques. Celles apportées par la clinique seront le tracé du pouls, de la température, de la respiration, la marche de l'albuminurie, l'état général, et, comme cela doit

1. Dans 7 cas, il y a eu des complications diphtériques par contagion après la trachéotomie.

être, il y a accord entre les conclusions du bactériologue et celles du clinicien, grâce à ce point de départ indispensable : un diagnostic certain.

A tous ces éléments, il faut encore joindre, pour faire un pronostic dans les diphtéries à associations, la connaissance des microbes associés au bacille diphtérique. Il est établi, en effet, que la présence de certains coccus à côté du bacille spécifique entraîne un pronostic favorable; que celle de certains autres et surtout de quelques streptocoques commande un pronostic grave. Certaines bactéries semblent gêner le développement du bacille de Klebs-Löffler, d'autres au contraire le favoriser. On conçoit combien la question peut se compliquer quand il s'agit de ces associations microbiennes auxquelles tant de bactéries peuvent prendre part, surtout quand le siège de l'affection est la bouche et la trachée. Cependant il y a de ces associations qui ont des allures bactériologiques et cliniques si spéciales qu'elles se distinguent de toutes les autres : nous avons pensé qu'il y avait intérêt à insister sur elles et à les décrire, malgré que d'autres s'en soient déjà occupés.

Les malades qui nous ont fourni la matière de ces recherches sont tous entrés au pavillon de la diphtérie à l'Hôpital des Enfants. Un nombre notable d'entre eux nous ont cependant donné l'occasion d'étudier des angines à fausses membranes, et même des croups d'emblée qui n'étaient point diphtériques; c'est la meilleure preuve que le diagnostic n'est jamais sûr quand il n'est pas bactériologique.

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE LA PSEUDO-TUBERCULOSE ASPERGILLAIRE

PAR LE Dr E. KOTLIAR (de Saint Pétersbourg).

(Travail du Laboratoire du professeur Duclaux, à l'Institut Pasteur.)

I

Les cas de pseudo-tuberculose aspergillaire pure observés dans ces dernières années chez l'homme ont eu pour résultat d'attirer plus sérieusement, sur cette forme morbide, l'attention des cliniciens et des expérimentateurs. Il en est résulté une série de travaux qui ont permis d'ériger cette forme de pseudo-tuberculose en une entité pathologique autonome, possédant une étiologie, une symptomatologie et une anatomie pathologique propres. Comme les travaux parus en France, surtout les récents (Dubreilh[1], Renon[2]), contiennent un historique assez détaillé de cette forme de pseudo-tuberculose, je crois pouvoir me limiter à une étude très résumée de la bibliographie du sujet, afin de montrer l'état actuel de la question et les points principaux sur lesquels doit porter son étude.

On sait qu'actuellement on divise les pseudo-tuberculoses en deux grands groupes (Bruhl[3]). Laissant de côté le premier, le groupe des pseudo-tuberculoses *bactériennes*, sur lesquelles les *Annales* ont récemment renseigné leurs lecteurs, j'aborderai directement l'étude du second, le groupe des pseudo-tuberculoses *mycotiques* produites par l'*aspergillus*.

On connaît depuis longtemps des cas de formation, dans l'organisme, des tubercules d'origine mycotique.

Depuis Benett[4], qui a signalé l'existence de l'*aspergillus* dans les crachats d'un homme, on a publié une série d'observations (Pluyter[5], Kuchenmeister[6], Virchow[7], Conheim[8], Dusch

1. *Arch. de méd. expérim.*, 1891, p. 428 et 566.
2. *Rech. clin. et expérim. sur la pseudo-tuberc. aspergillaire*. Paris, 1893.
3. *Arch. gén. de médecine*, 1891, n° 1.
4-6. Cité d'après Virchow et Renon.
7. *Arch. pathol. Anat.*, 1856, IX, p. 557.
8. *Virchow's Arch.*, 1865, XXIII, p. 167.

et Pagenstecher[1], Friedreich[2], Furbringer[3]) où le champignon en question paraissait avoir produit la lésion pulmonaire et provoqué la formation de tubercules typiques. Tous ces cas sont restés rangés dans le groupe peu net et peu précis des tuberculoses de l'homme, jusqu'au moment où la découverte de Koch mit fin aux discussions relatives à la tuberculose, et fit séparer les cas de pseudo-tuberculose de ceux de tuberculose bacillaire spécifique. C'est de cette époque que date (Grawitz[4], Lichteim[5]) l'étude expérimentale des pseudo-tuberculoses, étude qui aboutit d'un côté au travail de Malassez et Vignal sur la pseudo-tuberculose bactérienne, *tuberculose zoogléique*, et de l'autre aux recherches de Grawitz (*loc. cit.*), Laulanié[6], établissant expérimentalement l'existence d'un autre groupe de pseudo-tuberculoses produites par l'*aspergillus*, et plus spécialement par l'*aspergillus fumigatus* (Lichtheim). Ce sont ces recherches qui, en portant atteinte à la théorie de la spécificité du tubercule, ont définitivement établi le rôle pathogène de l'*aspergillus fumigatus*. Dans les observations plus récentes de pseudo-tuberculose mycotique chez l'homme (Osler[7], Popoff[8]), le rôle pathogène de cette mucédinée résultait de sa présence dans les crachats, pendant que manquait le bacille de Koch.

On a ainsi constaté l'existence d'une affection pulmonaire présentant tous les symptômes d'une phtisie à bacilles de Koch, mais produite exclusivement par l'*aspergillus fumigatus*.

Ce fait ne pouvait manquer de frapper les cliniciens, et, en 1890, Dieulafoy, Chantemesse et Widal[9] ont fait au Congrès de Berlin une communication sur trois cas de pseudo-tuberculose aspergillaire observée chez des *gaveurs*. Leur étude, basée sur l'observation clinique systématiquement poursuivie même dans les détails, a donné pour ainsi dire le droit de cité à la

1. *Virchow's Archiv.*, 1865, XI, p. 561.
2. *Ibid.*, 1856, X, p. 510.
3. *Ibid.*, 1876, XLVI.
4. *Berlin. klin. Wochenschr.*, 1882, n° 14.
5. *Ibid.*, 1882, n°s 9, 10.
6. *Arch. de physiol.*, 1884.
7. *Transact. of the Pathol. Soc. of Philadelphia*, t. XII (cité d'après Renon).
8. *Baumgarten's Jahresberich*, 1887, *iii*, p. 316.
9. *Gaz. des hôpitaux*, 1890, p. 821.

pseudo-tuberculose aspergillaire, en tant que maladie spéciale nettement caractérisée chez l'homme aussi bien au point de vue clinique qu'anatomo-pathologique. Et c'est ainsi qu'après la communication en question nous voyons Potain[1], Rubert Boyce[2], Renon (*loc. cit.*) publier à leur tour des observations cliniques de pseudo-tuberculose aspergillaire chez l'homme.

Bien que les cas n'en soient pas nombreux, ils se ressemblent tellement qu'il est très facile d'en dégager la physionomie clinique de cette affection, qui, dans ses détails comme par son côté général, simule entièrement la véritable tuberculose pulmonaire. Les symptômes et les signes objectifs du côté des poumons sont les mêmes dans les deux; les phénomènes généraux, la fièvre, l'amaigrissement, sont moins accusés dans la pseudo-tuberculose aspergillaire. La seule différence importante en l'espèce réside dans la terminaison : la pseudo-tuberculose aspergillaire cède en effet facilement au traitement (traitement général, bien entendu, et non pas spécifique) et se termine toujours par la guérison, à en juger, du moins, par les cas publiés jusqu'à présent.

Les lésions anatomo-pathologiques, étudiées, on le comprend, exclusivement chez des animaux (pigeons, lapins) rappellent, sous tous les rapports, celles de la tuberculose pulmonaire vraie. Tous les auteurs, Ribbert[3], Laulanié (*loc. cit.*), Dieulafoy, Chantemesse et Widal (*loc. cit.*), Renon (*loc. cit.*), qui ont étudié le développement des tubercules dans le foie, les poumons des animaux inoculés dans le sang avec les spores d'*aspergillus fumigatus*, sont d'accord sur ce fait que, lorsqu'on expérimente avec des doses faibles, les spores s'entourent rapidement de leucocytes et sont, dans un espace de temps relativement court, absorbées par des cellules géantes, de sorte que le mycélium n'arrive d'ordinaire pas à un développement considérable à l'intérieur du tubercule. Mais avec des doses considérables, de même que dans les tubercules anciens, on observe ordinairement au centre de ces tubercules un feutrage de mycélium dont les ramifications affectent un aspect varié, en ce sens qu'à côté des hyphes vivants

1. *Union médicale*, 1891, n° 38.
2. *Journ. of the Pathol. and Bacteriol.*, 1892, vol. X, p. 165.
3. *Der Untergang pathog. Schimmelpilze im Korper*. Bonn, 1887

se colorant bien, on en trouve d'autres présentant déjà des phénomènes d'involution plus ou moins accusés. D'après Dieulafoy, Chantemesse et Widal, ces divers stades d'involution des hyphes se rencontreraient ordinairement dans les tubercules composés d'une seule grande cellule polynucléaire.

Les corps étoilés décrits pour la première fois par Lichtheim et rappelant les actinomyces bien développés, ont été rencontrés par d'autres auteurs chez des animaux, et par Boyce chez un homme qui avait succombé à une affection du cœur, et à l'autopsie duquel on trouva une pseudo-tuberculose aspergillaire pure. L'observation de R. Boyce, qui confirme les données de l'expérimentation chez les animaux, a une importance toute particulière en ce sens qu'elle est la seule où l'on ait pu faire sous le microscope l'examen systématique des lésions produites chez l'homme par l'*aspergillus fumigatus*.

Tous les cas de pseudo-tuberculose aspergillaire de l'homme ont été observés chez des *gaveurs* de pigeons. Dans ces conditions, il était tout naturel d'envisager cette affection comme une maladie professionnelle, et de chercher la cause de l'infection dans les conditions mêmes du métier en question. On sait que pour gaver les pigeons, les gaveurs se remplissent la bouche d'un mélange d'eau et de graines et, en appliquant contre leurs lèvres le bec entr'ouvert des pigeons, leur insufflent les graines. En examinant attentivement la muqueuse de la cavité buccale des pigeons, Dieulafoy, Chantemesse et Widal y trouvèrent, à côté de la lésion connue sous le nom de *chancre des pigeons*, une autre espèce de tumeur produite par un champignon qui, ensemencé sur un milieu approprié, fut reconnu pour l'*aspergillus fumigatus*. Pour ces auteurs, l'infection des gaveurs peut donc se réaliser de deux façons : ou bien par contact direct avec la muqueuse buccale malade des pigeons, ou bien par contact direct avec les graines sur la surface desquelles pouvaient se trouver les spores d'*aspergillus fumigatus*. La possibilité du second mode d'infection, soupçonnée également par Potain, a été définitivement établie par les recherches de Renon qui, en ensemençant sur des milieux nutritifs plusieurs échantillons de graines de millet et de vesce, obtint des cultures de diverses espèces d'*aspergillus*, parmi lesquelles l'*aspergillus fumigatus* était la plus rare.

Le travail très consciencieux de Renon, fait au laboratoire du professeur Dieulafoy, et basé sur l'étude de deux cas de pseudo-tuberculose aspergillaire et toute une série d'expériences sur des animaux, est le dernier en date et résume en quelque sorte l'état actuel de la question.

II

Mais si toutes ces recherches établissent bien ce rôle pathogène de l'*aspergillus fumigatus*, non seulement vis-à-vis des pigeons et lapins, mais encore vis-à-vis de l'homme, elles rendent encore plus nécessaire d'élucider, même dans ses détails, le mécanisme de l'infection, et de se poser à son sujet la question qui se dresse actuellement devant toute maladie infectieuse.

La pseudo-tuberculose aspergillaire est-elle, comme toutes les maladies contagieuses bactériennes, le résultat d'un empoisonnement de l'organisme par les toxines sécrétées par l'*aspergillus*? Telle est la question que je me suis proposé d'élucider dans ce travail.

Mes expériences ont été faites sur des pigeons, animaux qui, comme on sait, sont particulièrement sensibles à l'*aspergillus fumigatus*. Grâce à l'obligeance de M. Renon, j'ai obtenu une culture fraîche d'*aspergillus*, dont j'ai exalté la virulence en le faisant passer par l'organisme d'une série de pigeons.

Comme milieu de culture, je me servais au début du liquide de Raulin, préparé au fur et à mesure des besoins, à la façon ordinaire.

L'*aspergillus fumigatus* s'y développe fort bien, surtout à 22°. On prenait toujours la même quantité de milieu nutritif. (10 c. c. de liquide de Raulin et plus tard de bouillon), qu'on mettait dans un matras Pasteur, et qu'on ensemençait, autant que possible, avec la même quantité de spores. A cet effet, ces dernières étaient soigneusement mêlées dans une éprouvette avec le milieu nutritif, et on prenait ensuite, avec une anse de platine, une certaine quantité de ce mélange pour l'ensemencement. Dans ces conditions, 1 c. c. 5 d'une culture d'*aspergillus fumigatus* vieille de 5 jours suffisait pour amener la mort d'un pigeon moyen, au commencement du 5e jour après l'infection.

Pour déceler la présence des toxines dans mes cultures, j'eus

au début recours à la méthode généralement employée dans ces cas, celle de la stérilisation à une température élevée et de la filtration à travers le filtre Chamberland. Sur le nombre des pigeons destinés à l'expérience, une moitié recevait une certaine quantité de culture virulente de l'*aspergillus fumigatus*, l'autre la même quantité de culture préalablement stérilisée. Dans ces expériences, comme du reste dans toutes les autres, l'injection était toujours faite dans la veine axillaire. Il va de soi que j'ai commencé par établir que les pigeons n'étaient en rien incommodés par l'injection intra-veineuse de 1 c. c. 5 à 3 c. c. de liquide stérilisé de Raulin. Comme mes expériences ont été conduites de la façon habituelle, je puis ne pas les exposer en détail et passer directement aux résultats.

Dès les premières expériences, j'ai pu constater que les pigeons inoculés avec les cultures stérilisées de l'*aspergillus fumigatus* survivaient régulièrement aux injections sans présenter le moindre symptôme morbide; par contre, les pigeons témoins, qui avaient reçu la même quantité de cultures virulentes, succombaient régulièrement aux injections dans un espace de temps variable suivant la quantité de culture injectée. A l'autopsie de ces pigeons, on trouvait toujours le même tableau anatomique, identique à celui signalé par tous les auteurs, à savoir une éruption de tubercules dans les reins, la rate, plus rarement dans les poumons, toujours particulièrement abondants dans le foie. Si la dose injectée était forte (2 c. c. 5 à 3 c. c.), la mort survenait de bonne heure (au commencement du 3e jour), et les modifications macroscopiques étaient peu accusées . dans ces cas, on ne trouvait ordinairement des tubercules que dans le foie, tandis qu'à l'œil nu, les poumons, la rate paraissaient simplement hyperémiés. Mais lorsque la dose injectée était petite (1 c. c.), le processus marchait très lentement, et lorsque l'animal succombait, ordinairement au bout de 15 jours, les lésions tuberculeuses des organes parenchymateux, surtout celles du foie; étaient déjà très appréciables, même à l'œil nu. Dans ces cas, on pouvait observer tous les stades par lesquels passe le tubercule typique, en commençant par la dégénérescence et en finissant par la caséification et la formation de cavernes. La transformation fibreuse du tubercule, qui, comme on sait, est un mode de guérison spontanée, était observée assez souvent.

L'examen microscopique des organes parenchymateux de ces pigeons permettait de constater facilement l'existence des modifications anatomiques caractéristiques de la tuberculose vraie. Sur des coupes, principalement sur celles du foie, montées dans de la celloïdine et diversement colorées (violet de gentiane pendant 15 à 20 minutes, picrocarmin avec traitement ultérieur d'après le procédé de Weigert et décoloration à l'huile d'aniline), on voyait des tubercules à divers stades de leur développement; de tout jeunes formés par une accumulation de leucocytes, aussi bien que de vieux, typiques, complètement formés. Dans tous ces tubercules, de même que dans les espaces inter-cellulaires, on trouvait des hyphes de l'*aspergillus fumigatus* plus ou moins bien conservés, plus ou moins bien colorés, libres lorsqu'ils se trouvaient dans les espaces intercellulaires, et formant quelquefois à l'intérieur du tubercule un feutrage épais de mycélium.

A chaque autopsie, on faisait immédiatement l'ensemencement des organes parenchymateux sur divers milieux nutritifs (bouillon, gélose, gélatine, liquide de Raulin). On obtenait dans ces conditions des cultures d'*aspergillus fumigatus*; jamais on n'a observé, sur les milieux ensemencés avec les organes des pigeons ayant succombé à la pseudo-tuberculose aspergillaire, le développement d'autres bactéries. Disons enfin que ces essais de culture ont également montré que c'était le foie qui contenait, d'une façon la plus constante, le plus grand nombre de spores virulentes.

Ces résultats, négatifs au point de vue de la formation des toxines, pouvaient être interprétés de trois façons : ou bien l'*aspergillus fumigatus* était incapable de former des toxines; ou bien le liquide de Raulin, liquide non-albumineux, était un milieu impropre à leur formation; ou bien, enfin, le procédé de stérilisation employé détruisait les toxines formées par l'*aspergillus*.

On pouvait éliminer tout de suite l'influence du mode de stérilisation en profitant de ce qu'on avait affaire, non pas à une bactérie, mais à un champignon dont les cellules et les spores sont relativement volumineuses et peuvent être retenues, sinon complètement, mais d'une façon suffisante par une simple filtration à travers un triple filtre stérilisé. L'injection intraveineuse du liquide ainsi filtré ne produisait pas toujours les mêmes effets;

en ce sens que les pigeons inoculés avec la même quantité d'une culture de 5 jours, simplement filtrée sur papier, tantôt succombaient, tantôt restaient en vie sans avoir présenté de symptômes morbides. A l'autopsie des pigeons qui succombaient dans ces conditions, à côté du tableau bien connu de la pseudo-tuberculose aspergillaire, on constatait toujours la présence de l'*aspergillus*. Par contre, à l'autopsie des pigeons qui, restés en pleine santé, étaient sacrifiés quelques mois après l'injection, on ne trouvait aucune lésion pseudo-tuberculeuse, et l'ensemencement sur divers milieux des organes parenchymateux donnait toujours des résultats négatifs au point de vue de la présence de l'*aspergillus*.

Il est évident qu'il ne pouvait ici être question d'une modification ou d'une destruction des toxines contenues dans les cultures. Les expériences en question montrent au contraire que dans le liquide de Raulin, du moins, l'*aspergillus fumigatus* ne forme pas de toxines. Si le filtre retient toutes les spores, ou n'en laisse passer qu'un petit nombre, l'animal, dans ce dernier cas, a rapidement raison d'elles et survit à l'infection, qui ne provoque chez lui aucune réaction appréciable; si par contre il passe à travers le filtre un grand nombre de spores, l'animal succombe avec les mêmes phénomènes qu'on observe après l'injection de cultures non filtrées, avec cette seule différence que, dans le premier cas, la mort survient plus tardivement, à cause du petit nombre de spores virulentes introduites dans l'organisme.

Il devient donc impossible d'attribuer au procédé de stérilisation les résultats négatifs de nos premières expériences avec les cultures stérilisées. On peut donc conclure de ces faits que les cultures d'*aspergillus fumigatus* sur le liquide de Raulin *ne renferment pas de toxines,* qu'il s'agisse des cultures stérilisées ou simplement filtrées.

Pour voir si l'absence des toxines ne tenait pas au milieu non albumineux sur lequel poussait l'*aspergillus*, j'ai fait une série d'expériences avec des cultures sur bouillon peptonisé. Les résultats furent aussi négatifs que dans les expériences précédentes. Les cultures sur bouillon, une fois stérilisées, ne provoquaient jamais la mort des animaux, lorsqu'elles étaient simplement filtrées, et ne tuaient l'animal que lorsque le filtre avait laissé passer un nombre suffisant de spores. L'ensemence-

ment des organes des pigeons ayant succombé dans ces conditions donnait toujours naissance à des cultures d'*aspergillus fumigatus*; par contre, le résultat était négatif lorsqu'on faisait l'ensemencement des organes des pigeons qui avaient fort bien supporté l'injection, et étaient sacrifiés en pleine santé un ou deux mois après l'inoculation.

La conclusion qui ressort de ces deux séries d'expériences est que l'*aspergillus* ne forme de toxines ni sur un milieu non albumineux, comme le liquide de Raulin, ni sur un milieu faiblement albumineux, c'est-à-dire ne contenant qu'une très faible proportion de substances albuminoïdes. On est donc autorisé à admettre que, *d'une façon générale, l'aspergillus fumigatus ne forme pas de toxines dans les milieux dans lesquels on le cultive ordinairement.*

Il va de soi que ces expériences, avec un bouillon qu'on pouvait considérer comme faiblement albuminoïde seulement par comparaison avec le liquide de Raulin, laissent encore ouverte la question de savoir si, par analogie avec certaines bactéries (choléra des poules), l'*aspergillus* n'acquiert pas le pouvoir de former des toxines lorsqu'il est cultivé sur des milieux *riches* en albumine, comme le sérum par exemple.

Il est encore difficile de préciser le mécanisme de cette infection aspergillaire. Jusqu'à présent on n'a pas trouvé dans les tissus de lésions spécifiques pouvant expliquer la mort. Il est certain que les fonctions des tissus doivent être notablement affaiblies par la pénétration purement mécanique et le développement, dans leur intérieur, de l'*aspergillus*, et que cette pénétration doit forcément avoir pour conséquence un affaiblissement de l'activité biologique de tout l'organisme, une diminution de sa force de résistance envers les influences nocives. Peut-on attribuer la mort de l'animal à l'invasion de l'organisme par les microbes contenus dans son intestin, et qui deviennent capables de pénétrer dans l'économie une fois que celle-ci est affaiblie par la pullulation de l'*aspergillus*? Je ne le crois pas, car l'ensemencement du sang et des organes parenchymateux des pigeons ayant succombé à la pseudo-tuberculose, n'a jamais donné naissance à d'autres cultures qu'à celles de l'*aspergillus fumigatus*.

A l'autopsie de certains pigeons qui succombaient dans un

temps relativement court après l'infection, on trouvait quelquefois des signes d'asphyxie très accusés qui, à un faible degré, existaient du reste chez tous les pigeons morts de pseudo-tuberculose aspergillaire. On peut donc se demander si la cause immédiate de la mort ne doit pas être cherchée justement dans cette asphyxie des tissus. Dans les organes parenchymateux, et d'une façon plus particulière dans le foie, l'*aspergillus fumigatus* se rencontre, comme nous l'avons dit, non seulement sous forme de spores, mais encore sous celle de mycélium qui, quelquefois, présente un développement considérable. Or, on sait que l'oxygène est nécessaire au développement du mycélium, et que cet oxygène n'a pas besoin d'être libre. Je pense donc que lorsqu'un animal succombe à l'infection aspergillaire, nous avons affaire au phénomène de concurrence vitale, de lutte pour l'oxygène engagée entre l'organisme et l'*aspergillus*. La démonstration positive de cette hypothèse ne peut être fournie que par des recherches spéciales sur l'état de l'hémoglobine dans ce cas.

Tous les auteurs sont d'accord sur ce fait que, dans la pseudotuberculose, le foie est celui de tous les organes où les modifications anatomo-pathologiques sont le plus accusées, ce qui revient à dire que c'est dans le foie que la réaction de l'organisme, dans sa lutte contre l'invasion aspergillaire, se manifeste de la façon la plus vive. Il ne s'agit plus ici du rôle du foie comme agent destructeur des poisons venus soit du canal intestinal, soit des bactéries pathogènes, mais d'une lutte contre les cellules vivantes du végétal envahisseur. C'est de ce côté qu'il aurait été très intéressant de suivre les phénomènes de phagocytose observés par Dieulafoy, Chantemesse et Widal, et plus récemment par Boyce, et qui doivent être très accusés si l'on se rapporte aux dimensions considérables des cellules.

Avant de terminer mon travail, je tiens encore à dire deux mots sur quelques expériences que j'ai faites en vue de savoir si l'*aspergillus fumigatus* formait des substances vaccinantes. Trois pigeons, inoculés dans le sang avec 2 c. c. 5 de culture stérilisée, avaient reçu douze jours après 1 c. c. 5 de culture virulente. Les trois pigeons ont succombé au cinquième jour, de même que les pigeons témoins. Ces expériences sont trop peu nombreuses pour permettre d'affirmer que l'*aspergillus* ne forme pas de substances vaccinantes ; mais si l'on songe que ce cham-

pignon, comme nous l'avons démontré, ne forme pas de toxines, on peut en déduire qu'il ne fabrique pas de substances vaccinantes non plus.

Un autre point sur lequel je tiens à insister est le suivant. Sous le nom de « toxines » dont je me suis servi plusieurs fois dans mon travail, je comprends exclusivement les toxines extra-cellulaires, c'est-à-dire les substances toxiques que le microorganisme rejette dans le milieu dans lequel il se développe. En somme, ces substances ont le rôle principal, pour ne pas dire exclusif, dans les phénomènes d'intoxication. C'est dans ce sens que nous avons dit que l'*aspergillus fumigatus* ne forme pas de toxines extra-cellulaires sur des milieux non albumineux ou faiblement albuminoïdes. Quant à la question de savoir s'il en donne sur des milieux riches en albumine (sérum du sang) ou s'il renferme *dans ses cellules* des poisons diastasiques ou toxiques, c'est-à-dire des toxines *intracellulaires*, je me propose de l'étudier ultérieurement.

SUR UNE NOUVELLE SEPTICÉMIE HÉMORRAGIQUE

LA MALADIE DES PALOMBES

PAR M. E. LECLAINCHE

Professeur à l'École vétérinaire de Toulouse.

La maladie a été observée en octobre et novembre 1893, à Saint-Jean-de-Luz, sur des palombes capturées dans les environs (palombières de Sare) et entretenues en volières. Les oiseaux étaient séquestrés depuis quelques jours, lorsque la contagion apparut, en même temps, chez tous les éleveurs ; en huit jours, la mortalité avait atteint la proportion du tiers des effectifs.

Le 30 octobre et le 1er novembre, mon collègue M. Neumann recevait deux lots de palombes mortes ou malades, et il voulait bien me confier l'étude de la maladie. Les envois ont été faits par M. Leremboure (de Saint-Jean-de-Luz) qui nous a transmis, avec un empressement dont nous le remercions ici, les renseignements et les observations qu'il a pu recueillir.

I. — ÉTUDE CLINIQUE.

Symptômes: — Le début de l'infection est marqué par de la tristesse et de la somnolence. L'oiseau atteint reste immobile, les yeux clos ; il se met en boule et les plumes se hérissent. Sous l'influence des excitations diverses, le malade reprend un instant une attitude normale pour retomber aussitôt dans son état comateux.

En douze heures, généralement, parfois en six et même trois heures, tous ces symptômes se sont considérablement aggravés. La palombe, incapable de se tenir debout, reste affaissée, le ventre reposant sur le sol. Il se produit un flux diarrhéique, d'abord alimentaire, puis liquide, albumineux, de couleur verdâtre, mêlé de bulles gazeuses.

L'évolution est très rapide ; la faiblesse augmente et la mort

arrive, dans un état de sidération complète, en vingt-quatre ou quarante-huit heures en moyenne. Parfois les accidents affectent une forme convulsive ; l'oiseau tombe sur le côté ; on observe des contractions musculaires ; la tête se renverse violemment en arrière et le malade conserve cette position jusqu'au moment de la mort.

Lésions. — Les altérations portent principalement sur l'intestin grêle, dont la muqueuse est congestionnée, épaissie, parsemée de points hémorragiques. Les vaisseaux du mésentère sont gorgés de sang. Le foie est généralement volumineux, congestionné ; la rate est tuméfiée et friable. Les poumons sont normaux. Le myocarde a une teinte pâle, lavée ; le sang contenu dans les ventricules est coagulé. Il n'existe pas d'épanchement péricardique. Les muscles ont, en diverses régions, une teinte ocreuse et paraissent cuits.

Mode de l'infection. — L'origine de la maladie est indéterminée. S'il est admissible que certains animaux étaient affectés au moment de leur capture, une autre source peut être aussi soupçonnée. Il résulte, des renseignements fournis, que les palombes ont été transportées, des lieux de chasse à Saint-Jean-de-Luz, dans des paniers employés antérieurement pour l'importation de pigeons envoyés d'Anvers à Biarritz. L'hypothèse d'une contamination par les paniers est appuyée par cette considération qu'aucune maladie contagieuse des palombes n'a été observée auparavant. « C'est, certainement, la première fois qu'une épidémie semblable affecte ces oiseaux, écrit M. Lerembourе, car j'ai recueilli des renseignements très précis auprès de personnes qui, chaque année, conservent des palombes depuis plus de soixante ans, et jamais rien de semblable ne s'est produit. »

II. — Étude expérimentale.

Dans les tissus des palombes qui ont succombé à l'évolution naturelle de la maladie, on trouve constamment une bactérie ovoïde, identique dans sa forme à celle du choléra des poules, mais de dimensions un peu supérieures. Le microbe prend très facilement les couleurs d'aniline, et notamment le bleu de Löffler ; il ne conserve ni le Gram, ni le Weigert. La forme des bactéries varie suivant les milieux ; allongées, à pôles colorés et

à espace clair central dans les parenchymes, elles se montrent beaucoup plus courtes dans le sang, et elles prennent, dans les cultures, l'aspect de microcoques ou de diplocoques.

Les microbes sont abondants dans la rate, dans le foie, dans les reins; ils pullulent à la surface de la muqueuse intestinale enflammée et dans les déjections.

Cultures. — Les cultures sont facilement obtenues par l'ensemencement du sang ou des pulpes d'organes sur divers milieux.

Dans le bouillon de viande-peptone-sel (veau ou bœuf), à 37°, on trouve, après vingt-quatre heures, un dépôt pulvérulent abondant, le liquide restant parfaitement limpide. Les cultures conservent ces caractères pendant plusieurs mois, puis des masses caillebotées se développent dans les couches profondes. Dans les bouillons glycérinés ou additionnés de glucose, la culture s'opère avec la même facilité.

Sur bouillon-gélatine-peptone, en surface, à la température de la chambre, on voit après quarante-huit heures une couche semi-transparente d'un gris jaune, qui s'épaissit peu à peu et passe en quelques jours au blanc-porcelaine. Par piqûre, dans le même milieu, il se développe lentement des colonies blanches, homogènes, sur le trajet de l'aiguille. La gélatine n'est jamais liquéfiée.

Sur bouillon-gélose-peptone, à 37°, la surface ensemencée se couvre en vingt-quatre heures d'une couche grisâtre, transparente, qui s'épaissit lentement en conservant une teinte gris jaunâtre.

Sur sérum bœuf-peptone-glycérine, on obtient une couche grasse, d'un blanc sale, qui envahit peu à peu toute la surface.

Sur pomme de terre, la culture donne une couche peu épaisse de couleur gris jaune.

Dans le vide ou en présence de traces d'acide carbonique, la culture s'opère rapidement dans les divers bouillons. Il se forme un dépôt floconneux qui se dissout par l'agitation du liquide.

Inoculation. — La transmission expérimentale à la palombe est sûrement réalisée par l'inoculation des cultures. L'inoculation intra-veineuse tue en quarante-huit heures environ; l'ingestion d'une culture virulente, mêlée aux aliments, tue également en trois à six jours. Dans tous les cas, les symptômes et les lésions sont identiques à ceux de la maladie naturelle.

Le pigeon domestique est beaucoup plus résistant que la palombe; seule, l'injection intra-veineuse le tue à coup sûr, en quatre à six jours en moyenne. L'ingestion et l'inoculation sous-cutanée ne le tuent que dans la moitié des cas.

La poule est absolument réfractaire; l'inoculation sous-cutanée ou intra-musculaire, l'injection intra-veineuse de un à trois centimètres cubes de culture ne réussissent pas à la tuer.

Le lapin se montre très sensible à l'action du virus. L'injection intra-veineuse le tue régulièrement en quarante-huit heures. Les lésions consistent seulement en une congestion diffuse de l'intestin, avec foyers hémorragiques disséminés sur divers points de la muqueuse. Les bactéries se rencontrent en abondance dans la bile et dans l'urine. L'inoculation sous-cutanée tue presque toujours, en huit jours environ; au point d'inoculation, on rencontre un foyer étendu de dégénérescence caséeuse, intéressant à la fois la peau, le tissu cellulaire sous-cutané et les muscles voisins. Il existe des ecchymoses sur l'intestin, et parfois une légère péritonite sèche, avec adhérences des feuillets.

Le cobaye est tué en cinq jours environ, par l'inoculation intra-péritonéale, avec des lésions de péritonite exsudative. L'inoculation sous-cutanée, avec des cultures récentes, tue en dix jours en moyenne; on trouve au point d'inoculation un séquestre énorme, en voie de délimitation, de couleur gris-jaunâtre, comprenant une portion étendue des masses musculaires sous-jacentes. Les bactéries spécifiques pullulent dans tout le foyer de dégénérescence, mais on ne les rencontre nulle part ailleurs, et les cultures faites avec le sang ou les parenchymes restent stériles. La mort est donc déterminée, dans ce cas, par une intoxication due à la culture locale.

Le chat et le chien sont réfractaires aux divers modes de l'inoculation.

Résistance du microbe. — La bactérie de la maladie des palombes conserve, pendant plusieurs mois, sa virulence dans les cultures. Les cultures liquides, conservées en tubes clos, à l'abri de la lumière, possèdent toutes leurs propriétés après cinq et six mois.

Le microbe est très sensible à l'action de la chaleur; il est détruit par un chauffage de cinq minutes à 60°.

*
* *

Les caractères morphologiques et biologiques du microbe isolé montrent suffisamment que la *maladie des palombes* rentre dans le groupe des « septicémies hémorragiques » de Hueppe. Cette analogie est démontrée encore par les effets de la bactérie sur les réactifs animaux : comme tous les microbes du même type, elle produit, suivant le mode de l'inoculation et la réceptivité de l'organisme envahi, soit des lésions diffuses septicémiques, soit des altérations locales caractérisées par la dégénérescence caséeuse des tissus.

Par ses modes de réaction sur les diverses espèces animales, la maladie des palombes se différencie nettement de toutes les autres septicémies hémorragiques, et notamment de celles qui affectent les oiseaux, comme le choléra aviaire, le choléra des canards de Cornil et Toupet, la maladie des grouses de Klein, et les entérites diarrhéiques de Klein et de Lucet.

RECHERCHES SUR L'ÉTIOLOGIE
DE LA DYSENTERIE AIGUË DES PAYS CHAUDS

PAR M. LE Dr O. ARNAUD

Médecin aide-major de 1re classe.

(Travail du Laboratoire de Bactériologie de l'hôpital militaire de Tunis.)

La question de l'étiologie de la dysenterie aiguë est loin d'être encore résolue, malgré les nombreux travaux publiés dans ces dernières années [1]. Plusieurs organismes, d'ordre et de nature différents, se partagent actuellement la pathogénie de cette affection.

L'*Anguillula stercoralis* de Normand (1876) a été accusée de produire les selles muqueuses et sanglantes de la dysenterie. Mais il est reconnu aujourd'hui que cet agent appartient seulement à certaines diarrhées spéciales (Cochinchine).

La découverte de Lœsch, à Saint-Pétersbourg, en 1875, les résultats de ses expériences sur les chiens, ont attiré ensuite l'attention sur le rôle important qui paraissait dû à l'*Amœba coli* dans la production de la dysenterie. Les recherches multiples, entreprises depuis cette époque, ont établi la fréquence des amibes dans l'intestin des dysentériques (Normand, Sonsino, Grassi, Perroncito, Koch, Hlava, Massiutin, Dock, Nasse, Lutz, Eichenberg, Pasquale, Kruse, Kovacs, Quincke, West). Il convient de citer plus spécialement Kartulis. Osler, Councilman et Lafleur qui ont retrouvé, le premier en Égypte, les trois autres en Amérique, les amibes intestinales chez un grand nombre de malades, et ont assigné à ces parasites une action prépondérante

1. LAVERAN, Contribution à l'étude de l'étiologie de la dysenterie. (*Bulletin, Soc. Biologie,* séance du 4 novembre 1893.) — O. ARNAUD, même sujet, *Ibid,* 17 mars 1894.

dans l'étiologie de certaines dysenteries et des abcès du foie consécutifs.

Pour notre part, nous n'avons jamais constaté la présence de l'*Amœba coli* de Lœsch dans les selles de 60 dysentériques que nous avons analysées, et dans plusieurs abcès de foie.

Quoi qu'il en soit, il résulte de l'ensemble des recherches faites jusqu'à ce jour, que les amibes paraissent capables d'engendrer certaines formes de la dysenterie aiguë.

Une grande incertitude règne aussi vis-à-vis des microbes des selles dysentériques. En 1888, Chantemesse et Widal ont décrit un bacille peu mobile qu'ils avaient isolé dans cinq cas de dysenterie aiguë des pays chauds. Il semble que ce microorganisme, observé également par Ziegler et Klebs, doive être rapporté au *Bacillus coli communis*. Maggiora attribue d'ailleurs à ce dernier un grand rôle dans l'étiologie de la dysenterie (*Centralb. f. Bakt*, 1892, p. 173).

Pour Zancarol, ce sont les streptocoques qui donnent lieu à la dysenterie et aux abcès du foie (*Rev. de chirurgie*, août 1893).

Calmette, dans un travail récent, soutient que le *Bacillus pyocyaneus* est la cause la plus fréquente de la dysenterie (*Archiv. de méd. navale*, 1893).

Exceptionnellement, nous avons vu se développer dans quelques-unes de nos cultures le bacille du pus bleu, mais toujours à côté d'autres bactéries, et dans des selles n'ayant pas les vrais caractères dysentériques.

Pour Bertrand et Baucher, la dysenterie aiguë est produite par les microbes qui existent à l'état normal dans les voies digestives, soit que leur virulence s'exalte à un moment donné, soit que la muqueuse intestinale devienne plus vulnérable dans certaines conditions (*Gaz. hebdom.*, 6 octobre 1893).

Enfin, M. Laveran a communiqué à la Société de biologie (4 novembre 1893) les résultats de l'examen bactériologique des selles de dix malades. Une fois seulement, il a constaté, *en petit nombre*, la présence d'amibes; et M. Laveran conclut « que les amibes intestinales rencontrées une seule fois sur dix, et en petit nombre, dans la dysenterie aiguë de notre pays, ne sauraient être considérées comme étant la cause de cette dysenterie, non plus que les cercomonades ou les trichomonades que l'on rencontre également quelquefois dans les selles ».

Par contre, les recherches de M. Laveran lui ont permis de déceler dans les selles de ses dix malades la présence de bacilles en grande quantité, absolument identiques au *Bacillus coli communis*.

Il est démontré depuis longtemps que cet hôte habituel et inoffensif de l'intestin de l'homme, peut acquérir, dans certaines circonstances, une grande virulence et un pouvoir pathogène remarquable.

En dehors des cas de dysenterie, dont il vient d'être parlé, on l'a trouvé également dans des cas de choléra nostras, d'angiocholite, d'abcès du foie, etc.

Des recherches poursuivies pendant plusieurs années nous ont conduit aussi à admettre que le *Bacillus coli*, ou tout au moins une variété très voisine, paraît être la cause, sans doute la plus fréquente, de la dysenterie aiguë des pays chauds. Notre étude porte sur soixante cas de cette affection, dont cinquante-trois observés à l'hôpital militaire de Tunis.

Nous avons eu recours : 1° à des examens directs de selles dysentériques[1] ; 2° à des cultures obtenues avec ces matières ; 3° à des expériences sur les animaux.

Examen histologique. — De nombreux examens immédiats, faits avec des parcelles de mucus ou des matières sanglantes (fragments délayés dans de l'eau stérilisée et examinés directement, préparations fixées par dessiccation, puis coloriées, etc.), nous ont permis de déceler un bacille, qui se trouve le plus souvent seul dans le mucus.

Cultures. — Avec une anse de platine, stérilisée et plongée directement dans des produits dysentériques, on ensemençait deux tubes de bouillon simple ou phéniqué au millième, et deux tubes de gélose qui servaient ultérieurement à en ensemencer d'autres (gélatine, pomme de terre, etc.).

a) Les cultures, obtenues par prélèvements sur du mucus, sont presque toujours pures et fournissent constamment le même bacille mobile ;

b) Celles, faites à des périodes plus avancées de la crise dysentérique, c'est-à-dire avec des matières devenues diar-

1. Les matières n'étaient jamais mélangées à l'urine, le malade ayant à sa disposition deux vases préalablement ébouillantés, dont un était spécialement destiné à recevoir la selle dysentérique ; les ensemencements, comme les examens, étaient faits le plus souvent presque aussitôt après l'expulsion des matières.

rhéiques ou pâteuses et ne contenant que peu ou point de mucus ou de sang, sont au contraire fréquemment impures et offrent un mélange de divers organismes. Cependant, il n'est pas difficile, le plus souvent, d'arriver à isoler la même bactérie qui se trouvait seule dans les vrais produits dysentériques;

c) Enfin une troisième série de cultures acquises par prélèvements sur la rate, à l'autopsie d'un dysentérique, a donné lieu au développement du même bacille mobile, dont les caractères sont ceux du *Bacillus coli communis*.

C'est en effet un bâtonnet, mobile, aux extrémités régulières, qui se colore par toutes les couleurs d'aniline et se décolore par le Gram. Il fait fermenter rapidement un tube de bouillon, additionné de lactose et de carbonate de chaux. Il coagule le lait.

Sur la gélatine, qui n'est pas liquéfiée, il forme, le long de la strie d'ensemencement, une bande légèrement surélevée, d'aspect blanchâtre ou transparent, parfois brillant ou bleuté. Le plus souvent, une légère odeur se développe sur ce milieu.

Il en est de même avec la gélose, sur laquelle la poussée est très rapide ; ici, la culture est plus épaisse, blanchâtre ou grisâtre. Il en part parfois des arborisations de phosphate ammoniaco-magnésien [1], qui s'enfoncent dans la masse de gélose, n'allant pas, en général, au delà d'un centimètre de profondeur.

Sur la pomme de terre, la culture est épaisse, jaunâtre, couleur jaune maïs, ou couleur purée de pois.

Enfin ajoutons que le développement de ce microorganisme est rapide à la température ordinaire, mais surtout actif entre 35° et 38°.

L'ensemble des caractères morphologiques et bio-chimiques que nous venons d'exposer sommairement, appartient, sans conteste, au *Bacillus coli communis*.

Expériences sur les chiens. — Nos expériences, bien que peu nombreuses, semblent confirmer la spécificité *accidentelle* du microbe décrit ci-dessus. Nous avons procédé tantôt par inoculation sous-cutanée ou intra-péritonéale, tantôt en mélangeant

1. Ces arborisations, portées sur un nouveau tube de gélose, reproduisent les cultures primitives, mais sans « radicelles » nouvelles : à ces cristaux de phosphate ammoniaco-magnésien adhèrent en effet des germes en plus ou moins grand nombre.

aux aliments soit des produits dysentériques, soit des cultures pures obtenues avec ces produits. Les tentatives faites sur les rats blancs, les cobayes et les lapins ne nous ont pas donné de résultats, ces animaux mourant le plus souvent par infection générale très rapide.

D'autre part, il nous a paru que la seule méthode efficace pour essayer de reproduire une affection qui est et reste le plus souvent localisée dans le gros intestin, était de faire une inoculation rectale directe, en choisissant un animal qui ne fût pas réfractaire à la dysenterie. On sait que le chien prend facilement cette affection ; de plus, il se prête, mieux que tout autre, à des observations rigoureuses.

Des essais d'infection, à l'aide de soupe additionnée de cultures de *Bacillus coli*, n'ont abouti que dans quelques cas, en donnant des dysenteries légères.

L'inoculation intra-rectale nous a fourni des résultats beaucoup plus intéressants. Après avoir eu soin de faire un léger écouvillonnage du rectum, afin de le débarrasser des excréments qu'il contient, on injecte dans la cavité intestinale, à l'aide d'un flacon laveur, une culture en bouillon du bacille provenant des selles dysentériques, à des doses variant de 50 à 80 c. c.

a) Le 24 août 1893, deux chiens de petite taille reçoivent ainsi 50 c. c. de bouillon de culture. Les deux animaux prennent bientôt la dysenterie, leur cage est constamment souillée ; les selles sont nombreuses, fétides et composées de mucus et de sang. Le 31 août (7e jour), tous les deux meurent. Malheureusement, l'autopsie ne peut pas être faite.

b) Le 1er septembre 1893, trois chiens, de races différentes, reçoivent de 60 à 80 c. c. de bouillon de culture active. Tous les trois deviennent dysentériques. Les symptômes sont des plus nets ; les selles sont faites de mucus et de sang ; de plus, il est facile de se rendre compte que ces animaux éprouvent du ténesme rectal ; on les voit se tenir accroupis et attendre souvent longtemps avant d'expulser une selle très minime. Le 21 septembre (21e jour), un des chiens meurt. L'autopsie, faite quelques heures après, montre les lésions caractéristiques de la dysenterie. Le 5 octobre (35e jour) meurt un 2e chien, arrivé à un degré d'amaigrissement considérable. Les lésions dysentériques sont encore plus significatives que dans l'observation précédente. La partie inférieure du gros intestin est remplie de matières jaunâtres, mélangées à des mucosités. Une fois nettoyée, la muqueuse offre un aspect caractéristique : elle est parsemée de nombreuses ulcérations irrégulières, à bords taillés à pic, ayant détruit les divers feuillets de la paroi intestinale jusqu'à la séreuse, seule respectée. L'intestin grêle lui-même, sur un parcours de 1m,50 environ, est le siège d'une vive hypérémie, avec quelques

ulcérations discrètes arrivées à la même période que celles du gros intestin Le troisième chien, longtemps malade, se rétablit lentement.

En résumé, l'inoculation intra-rectale a rendu cinq chiens dysentériques sur cinq.

Les examens directs des selles dysentériques, les cultures faites avec ces mêmes produits, les expériences sur les animaux fournissent un ensemble de résultats, dont la concordance autorise à attribuer une spécificité accidentelle, mais réelle, au *bacillus coli communis*. Celui-ci paraît donc capable de produire la dysenterie, tout comme il peut engendrer du choléra nostras, des angiocholites, des abcès du foie, etc. Par suite de quelles circonstances, cet organisme, hôte habituellement inoffensif de l'intestin, arrive-t-il à acquérir cette virulence spéciale? Il faut sans doute invoquer les causes énumérées par M. Laveran dans une récente communication à la Société de Biologie : modification de la muqueuse intestinale, arrêt des sécrétions, changement dans la composition du mucus, phénomènes qui se produiraient plus souvent et avec plus d'intensité dans les pays chauds que dans les pays tempérés.

On doit également se demander, si, parfois, on n'absorbe pas directement le *Bacillus coli*, doué déjà de ces propriétés exceptionnelles. Il nous est arrivé d'isoler, dans des analyses d'eaux de boisson, provenant de garnisons différentes du nord de la Tunisie, un microbe absolument semblable à celui que nous avons décrit, et doué également de la faculté de former, sur gélose, des arborisations. En dehors de ce caractère spécial, la ressemblance avec le *bacillus coli* était frappante.

Nous ne prétendons pas que toute dysenterie aiguë soit due au *Bacillus coli communis*. Les nombreuses recherches, entreprises dans ces dernières années sur l'étiologie de cette affection, semblent en effet prouver l'existence de plusieurs variétés de dysenterie. Councilman en admet trois formes. Des maladies, caractérisées par des symptômes et des lésions anatomiques en apparence identiques, et désignées sous un même nom, peuvent, sans aucun doute, être provoquées par des microbes différents. Il est donc possible que certaines dysenteries relèvent exclusivement de l'*Amœba coli* de Lœsch ou encore d'un autre organisme inconnu.

Conclusions.

1° Les caractères morphologiques et bio-chimiques du bacille qui nous paraît être l'agent pathogène de la dysenterie des pays chauds, permettent d'identifier ce bacille au *Bacillus coli communis*, qui aurait acquis, sous l'influence de causes qui restent à déterminer, une suractivité végétative, en même temps que des qualités pathogènes spéciales ;

2° Plus la dysenterie est grave, plus le *Bacillus coli* tend à être seul dans le gros intestin et plus grande paraît être sa virulence.

SUR L'ACIDE CITRIQUE ET LE PHOSPHATE DE CHAUX

EN DISSOLUTION DANS LE LAIT

PAR M. L. VAUDIN

La nature des sels du lait, leur état physique, le mode de groupement des éléments acides et basiques que l'analyse immédiate permet d'y reconnaître, ont été étudiés sans grand succès, avant que M. Duclaux nous ait fait connaître sa méthode d'analyse et le résultat de ses recherches sur les phosphates du lait [1].

Dans le dernier travail, ce savant, après avoir établi par des dosages précis les quantités des divers phosphates trouvés, émet l'opinion suivante : « ... Le lait contient. dans sa partie soluble, des nombres à peu près égaux de molécules de phosphate tribasique de chaux, de phosphate bibasique de soude et de citrate de soude. Telle est au moins l'interprétation la plus légitime des nombres qui précèdent. »

J'essayerai dans ce qui suit de démontrer expérimentalement l'exactitude de cette hypothèse.

Tout d'abord j'indiquerai la marche que j'ai suivie pour prouver dans le lait l'existence de l'acide citrique qui a été signalée [2] il y a quelques années. Cette nouvelle preuve ne sera pas inutile, car les méthodes employées précédemment laissaient place au doute. L'extraction du citrate de chaux se faisait toujours à la suite d'une ébullition prolongée en liqueur calcaire acide; dans ces conditions, n'était-il pas à craindre qu'une partie de la lactose soit transformée en un produit acide analogue ou même identique à l'acide citrique [3] ?

1. *Annales de l'Institut Pasteur,* t. VII, p. 2.

2. Soxhlet, *Landw. Versuchst,* 1888, p. 101. — Henckel, *id.,* 1889, p. 143. — Scheiber, 1889, p. 153.

3. La saccharone, dont la formule chimique et les propriétés physiques et organoleptiques sont très voisines de celles de l'acide citrique, s'obtient par oxydation de la saccharine, préparée avec le sucre interverti ou le sucre de lait, et la chaux.

Dernièrement, M. Wehmer (*Bull. soc. chim.*, 1893, t. IX, p. 728) nous a appris que le glucose se transformait en acide citrique sous l'influence de certains champignons.

I. La recherche de cet acide dans le lait de vache a été effectuée de la façon suivante :

20 litres de lait frais écrémé à la machine centrifuge sont coagulés par la présure. Le sérum obtenu est traité par 4 à 5 grammes d'acide acétique, clarifié avec du blanc de Meudon en faisant bouillir quelques instants, et filtré. On traite par de l'acétate de plomb le liquide obtenu ; il se forme un précipité qui est recueilli sur un filtre, lavé, délayé ensuite dans l'eau distillée et soumis à un courant prolongé d'hydrogène sulfuré. Le sulfure de plomb est séparé par filtration, et le liquide clair, après concentration dans le vide à une basse température, est traité par un excès d'éther à 65°. On laisse en contact plusieurs jours en agitant fréquemment ; on décante ensuite la couche éthérée et on distille. Le résidu aqueux est placé dans le dessiccateur. On obtient ainsi des cristaux légèrement colorés qu'on essore et qu'on purifie par de nouvelles cristallisations.

Ces cristaux appartiennent au système orthorhombique ; ils ont la même composition élémentaire que l'acide citrique, et la solution est sans action sur la lumière polarisée [1]. Le point de fusion et l'acidité ont été déterminés. L'acide trouvé fond à 147°, et 100 grammes équivalent à 75,02 d'acide sulfurique SO^4H^2 ; l'acide citrique anhydre fond à 150°, et 100 grammes correspondent à 76gr,56 de SO^4H^2 (les légères différences observées sont dues à ce que le produit n'était pas complètement sec au moment des expériences).

Les réactions des sels de l'acide trouvé sont celles des citrates. L'acide citrique existe donc bien dans le lait de vache.

II. Quand on filtre au tube poreux du lait frais, à une température voisine de 0°, de manière qu'il ne subisse pas la fermentation lactique, et qu'ensuite on chauffe le produit filtré, il se sépare du phosphate tribasique de chaux. Le liquide, agité après refroidissement, redissout le sel qui s'est déposé.

J'ai fait cette expérience pour la première fois, dans le cours des recherches que j'avais entreprises pour déterminer les causes de l'acidité du lait [2]. L'interprétation de ce phénomène qui, à cette époque, m'avait semblé la plus rationnelle, était la

1. Je dois remercier M. Béhal, professeur agrégé à l'École de pharmacie, du concours obligeant qu'il m'a prêté pour arriver à la détermination de ces cristaux.
2. *Bulletin Soc. chim.*, 1892, t. VII, p. 489.

suivante : « La chaleur, en modifiant la matière protéique en dissolution dans le lait filtré, pour l'amener à une forme plus concrète et moins acide, a rendu impossible la solubilité totale du sel calcaire, et une certaine quantité s'est déposée. »

Cette manière de voir doit être modifiée : l'acide citrique contribue à maintenir en dissolution le phosphate de chaux, et l'expérience suivante prouve, ainsi que l'avait supposé M. Duclaux, que l'acide citrique est bien contenu dans le lait à l'état de citrate alcalin.

Si l'on traite du phosphate de chaux tribasique, obtenu à froid à l'état gélatineux, par le citrate neutre de soude, on obtient une solution qui abandonne à l'ébullition une grande partie du sel qu'elle contient. Le phosphate ainsi précipité se redissout difficilement à froid et d'une manière incomplète. Si la solution est faite en ajoutant partie équivalente de phosphate disodique, le précipité se redissout beaucoup mieux après refroidissement.

Partant de ces données, j'ai préparé, au moyen du citrate de soude, une solution contenant par litre 1 gramme de phosphate tricalcique et $2^{gr},30$ de phosphate disodique cristallisé pur. Pour obtenir une solution parfaitement limpide, il est nécessaire d'employer une proportion de citrate supérieure à celle correspondant à l'acide citrique trouvé dans le lait; mais ce fait n'a rien de surprenant, car nous ne pouvons reproduire fidèlement dans le laboratoire les réactions qui s'accomplissent dans l'organisme; il est aussi à remarquer que la facilité avec laquelle les phosphates gélatineux se dissolvent dans les acides étendus ou le citrate alcalin est variable d'une expérience à l'autre; enfin, on ne peut non plus affirmer d'une manière absolue, étant données nos connaissances si incertaines touchant les matières protéiques, qu'elles ne jouent aucun rôle dans la solubilité des sels terreux que le lait tient en dissolution.

Quoi qu'il en soit, la solution obtenue a été soumise à l'action de la chaleur, elle s'est comportée comme le lait filtré, sauf qu'il a fallu atteindre une température plus élevée pour déterminer la précipitation du phosphate de chaux.

En résumé, il résulte de ce qui précède que l'acide citrique à l'état de sel alcalin contenu dans le lait contribue, pour la plus grande partie, sinon entièrement, à maintenir en dissolution le phosphate de chaux du sérum lacté, et que les citrates et phos

phates alcalins et le phosphate de chaux dissous existent dans le lait dans des proportions relatives bien définies.

III. L'acide citrique existe dans le lait des animaux dans des proportions variables; dans le lait de vache, son poids est compris entre 1 gramme et 1gr,50 par litre; dans le lait de jument, il est de 60 à 80 centigrammes. Or, on sait que dans ce dernier, comme du reste dans tous les laits des animaux à croissance lente, la proportion des cendres et des phosphates est peu élevée; il y a donc une corrélation très évidente entre la teneur en éléments phosphatés et la richesse du lait en acide citrique.

Comment expliquer la présence de cet acide dans le lait? Quelques chimistes ont pensé qu'il provenait des aliments absorbés; cette supposition ne me paraît pas acceptable : l'acide citrique introduit dans l'économie doit être détruit pendant la digestion; il paraît plus vraisemblable d'admettre que cette formation s'effectue aux dépens de la lactose dans la glande mammaire, dont la *fonction citrogénique*, variable avec les espèces, assure la solubilité partielle du phosphate de chaux contenu dans le lait.

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DU COLOSTRUM DE LA VACHE

PAR M. V. HOUDET

Professeur à l'École de laiterie de Poligny (Jura).

Les connaissances que nous avons au sujet du colostrum ne sont ni étendues ni précises. Les analyses publiées lui attribuent une teneur moyenne en matières albuminoïdes notablement supérieure à celle du lait, puisqu'elle est voisine de 15 0/0 ; mais cette teneur semble très variable d'un échantillon à l'autre et oscille entre 13 et 27 0/0. Dans certains échantillons on n'a pas rencontré de lactose[1]. Boussingault en a trouvé 3,10 0/0 dans l'échantillon qu'il a analysé. La matière grasse semble aussi fort variable, de 2 0/0 à 8 0/0 et au delà, et on ne sait rien sur la cause ou la loi de ces variations.

Peut-être cela tient-il à ce que le colostrum a rarement été analysé d'une façon méthodique; j'ai voulu essayer de combler cette lacune. Dans l'étude de ce liquide, je me suis en outre demandé si on ne tirerait pas quelques lumières nouvelles en appliquant la méthode d'analyse de M. Duclaux, qui sépare les éléments en solution des éléments en suspension. Enfin, j'ai pensé que le colostrum n'est pas la première sécrétion des mamelles de l'animal en gestation. Il est précédé, comme l'a signalé Lassaigne[2], par un liquide qui commence à apparaître deux mois environ avant le part, et qui, d'après les analyses de ce savant, contient uniquement de l'albumine. J'ai commencé par l'étude de cette sécrétion.

1. Voir SANSON, *Traité de zootechnie*, t. I, p. 428.
2. LASSAIGNE, *Annales de Phys. et de Chimie*, 1837, 1841.

ÉTUDE DU LIQUIDE QUI PRÉCÈDE LE COLOSTRUM.

Cette sécrétion se présente le plus souvent sous deux aspects bien distincts. Tantôt elle est visqueuse et de couleur brunâtre; tantôt elle est liquide et de couleur jaune citrine. Ces deux formes ne sont, du reste, pas toujours exclusives l'une de l'autre, et peuvent coexister dans un même animal, un ou deux trayons fournissant la première, et les autres la seconde. J'ai notamment constaté ce fait sur une vache, trois mois avant le vêlage.

1° *Colostrum visqueux.* — En masses, il ressemble à du miel; sous une faible épaisseur, il ressemble à de la gélatine. Sa teinte brune devient parfois rosée par suite de la présence des globules sanguins. Il se délaie dans l'eau et fournit un liquide dont la saveur est albumineuse, et qui, chauffé, se prend en masse à la façon du caillé du lait ordinaire. Il ne se coagule pas par la présure, mais précipite par les réactifs des matières albuminoïdes, acide acétique, bichlorure de mercure, alcool.

En dissolvant 12gr,75 de cette matière visqueuse dans 200 c. c. d'eau, j'ai obtenu un liquide limpide qui, évaporé, laissait 2,35 0/0 de résidu à 100° avant filtration sur une bougie Chamberland, et 1,45 après. Les matières minérales n'étaient qu'en proportions très faibles, et de plus le microscope ni le lavage à l'éther n'ont pu y déceler la moindre trace de matières grasses. D'après cela le colostrum visqueux analysé avait la composition suivante :

Matières albuminoïdes solubles dans l'eau	22,74
Matières albuminoïdes insolubles	14,12
Eau	63,14
Matières minérales	traces.
	100,00

On voit que les 4/7 environ de la matière albuminoïde de cette sécrétion sont solubles dans l'eau au point de pouvoir passer au travers d'un filtre de porcelaine. Le reste est évidemment à l'état de suspension muqueuse, comme le sera plus tard la caséine dans le lait, mais ce n'est pas encore de la caséine, bien qu'elle soit précipitable par les acides, ou plutôt, elle ou le milieu n'ont pas encore pris la constitution qui rendra la masse sensible à l'action de la présure.

Il est difficile de préciser vers quelle époque de la gestation la mamelle de la vache sécrète ce colostrum visqueux.

Chez certains sujets, nous l'avons observé plus de deux mois avant le part ; chez d'autres, au contraire, il ne le précède que de trois semaines environ. — Quelques jours avant la naissance du veau, il se modifie et devient semblable au colostrum proprement dit.

2° *Colostrum fluide.* — Ce liquide, d'une saveur albumineuse, est aussi une émulsion; au microscope, il montre, avec de petits globules gras, quelques corps granuleux de Donné. En général, il est très fluide et ne donne de précipité appréciable que lorsqu'on le traite par le bichlorure de mercure et l'alcool. Cependant, lorsqu'il n'est pas trop aqueux, il se comporte comme le colostrum précédent vis-à-vis de la chaleur, de l'acide acétique et de la présure.

Sa composition, rapportée à 100 c. c., est la suivante :

	Éléments en suspension. — Grammes.	Éléments en solution. — Grammes.
Matière grasse	0.15	»
Lactose	»	0.80
Matière albuminoïde	4.39	1.38
Phosphate de chaux	0.03	0.08
Autres sels	0.14	0.24
Extrait sec	7gr,21	

Ces chiffres montrent que le colostrum fluide, bien qu'il se comporte dans certains cas comme le colostrum visqueux, lorsqu'il se trouve en contact avec les mêmes réactifs, en diffère surtout par la présence de la matière grasse et du lactose et par une plus grande proportion de matières minérales. En outre, sa matière albuminoïde est surtout à l'état de suspension, et non à l'état de solution parfaite. En somme, sauf la proportion de matière grasse et de lactose, c'est déjà du lait.

Le colostrum fluide s'observe aux mêmes époques de la gestation que le colostrum visqueux. Dans les quatre à cinq jours qui précèdent le part, il disparaît totalement pour faire place au colostrum proprement dit, et il est curieux de voir la transformation qu'il subit à ce moment. On pourrait croire, après ce que nous venons de dire, qu'il se contente de se peupler des éléments qui lui manquaient pour ressembler complètement à du lait. Nous allons voir qu'il subit, au contraire, une rénovation profonde.

Étude du colostrum proprement dit.

Le colostrum proprement dit succède aux liquides que nous venons d'étudier trois à six jours avant la naissance du veau. C'est un liquide épais, gluant, d'une couleur jaunâtre et d'une saveur âcre et albumineuse. Quelquefois, il prend une couleur terreuse ou rosée, due à la présence d'une petite quantité de sang; ce dernier est même assez abondant, dans certains cas, pour donner au liquide une coloration rouge brique. La réaction du colostrum n'est pas nettement marquée ; elle est tantôt acide, tantôt alcaline, tantôt amphotère. Ainsi que l'a constaté M. Fleischmann [1], il présente au microscope, outre les globules gras et les corpuscules granuleux de Donné, des fragments de ces corps plus ou moins désagrégés.

Divers essais de barattage, que nous avons faits avec ce liquide, n'ont donné aucun résultat après deux heures et demie d'agitation ; toutefois, en soumettant du colostrum à l'action de la force centrifuge, dans une écrémeuse *Mélotte* à cloisonnements, nous avons obtenu une masse jaune comme le beurre, ayant son aspect, sa consistance, son odeur et son goût, soluble dans l'éther et le sulfure de carbone, entrant en fusion à la même température et pouvant se délaiter comme lui par le malaxage.

Le colostrum coagule sous l'influence de la chaleur, de l'acide acétique, du bichlorure de mercure, de l'alcool et de la présure ; avec la potasse, il donne un précipité verdâtre et gélatineux. A mesure que sa composition se rapproche de celle du lait normal, il se coagule de moins en moins facilement par la chaleur, sa couleur jaune disparaît peu à peu ; mais, d'après Bouchardat et Quévenne [2], il contient encore, pendant quinze jours à trois semaines, les corps granuleux de Donné.

Nous avons suivi, au moyen de l'analyse, les variations qui se produisent dans la composition chimique du colostrum, depuis son apparition jusqu'au moment où il devient lait normal ; les tableaux suivants donnent les résultats que nous avons obtenus, rapportés à 100 c. c.

Voyons d'abord la transition entre la sécrétion que nous

1 Fleischmann, *L'Industrie laitière*, traduction de MM. Brelaz et Oettli, Paris, Dunod, 1884.

2. Bouchardat et Quevenne, *Du Lait*, Paris, 1857.

venons d'analyser et le colostrum typique. Voici des analyses du colostrum d'une vache normande qui avait fourni jusque-là du colostrum fluide. Les analyses ont été faites par la méthode de M. Duclaux, six jours (A), quatre jours (B), avant le part, et (C) aussitôt après le part. On y a fait la distinction des éléments en suspension et des éléments en solution.

	A		B		C	
	Susp.	Sol.	Susp.	Sol.	Susp.	Sol.
Matière grasse	0.50	»	3.01	»	3.14	»
Lactose	»	2.55	»	3.17	»	2.70
Matière albuminoïde	17.13	0.47	12.08	0.45	14.53	0.25
Phosphate de chaux	0.33	0.11	0.37	0.10	0.35	0.11
Sels minéraux	0.28	0.08	0.25	0.15	0.28	0.14
Extrait sec	21.45		19.58		21.50	

On voit que sa teneur en albumine a subitement augmenté, comme par suite du déversement dans le lait de tout ou partie de la matière nutritive qui allait jusque-là au fœtus et à ses annexes. Seulement, cette matière albuminoïde est, comme dans le lait, presque entièrement insoluble dans l'eau. Il n'y en a qu'une petite fraction en solution véritable et filtrable au travers de la porcelaine. La matière grasse augmente aussi, et de même le phosphate de chaux qui atteint déjà, le jour du part, l'état d'équilibre qu'il conservera pendant presque toute la durée de la sécrétion lactée.

Cherchons maintenant la transition du colostrum au lait. Voici, disposés comme plus haut, les chiffres relatifs à une vache normande qui avait vêlé le 12 novembre, et dont le lait a été étudié à diverses dates après le jour du part.

	12 novembre.		13 novembre.		14 novembre.	
	Susp.	Sol.	Susp.	Sol.	Susp.	Sol.
Matière grasse	5.69	»	4.48	»	5.70	»
Lactose	»	3.30	»	4.05	»	4.32
Matière albuminoïde	14.05	0.51	5.21	0.93	3.52	1.98
Phosphate de chaux	0.39	0.12	0.33	0.10	0.23	0.20
Sels minéraux	0.44	0.10	0.31	0.12	»	0.45
Extrait sec	24.60		15.53		16.10	

On voit que, brusquement, le lendemain du part, la teneur en matière albuminoïde totale tombe brusquement, mais ce qui diminue, c'est surtout la matière albuminoïde en suspension, car pour celle en solution, elle passe par quelques oscillations

avant de revenir à son chiffre normal, comme le montrent les analyses suivantes qui font suite aux premières :

	15 novembre.		16 novembre.		18 novembre.	
	Susp.	Sol.	Susp.	Sol.	Susp.	Sol.
Matière grasse	7.40	»	3.20	»	4.20	»
Lactose	»	4.26	»	4.44	»	4.64
Matière albuminoïde	3.45	2.41	5.20	0.56	4.02	1.19
Phosphate de chaux	0.22	0.21	0.26	0.14	0.18	0.20
Sels minéraux	»	0.40	»	0.30	»	0.29
Extrait sec	18.35		14.10		14.72	

Le dernier échantillon analysé est presque du lait. La proportion de matière albuminoïde soluble est encore supérieure à la normale, mais tout rentre bientôt dans l'ordre, comme le montrent les chiffres suivants :

	20 novembre.		28 novembre.	
	Susp.	Sol.	Susp.	Sol.
Matière grasse	4.10	»	3.85	»
Lactose	»	4.96	»	5.03
Matière albuminoïde	3.56	0.48	3.74	0.58
Phosphate de chaux	0.27	0.13	0.20	0.15
Sels minéraux	»	0.30	»	0.36
Extrait sec	13.80		13.91	

Les analyses suivantes, dans lesquelles le départ n'a pas été fait entre les matières en suspension et les matières en solution, montrent que les résultats que nous avons signalés ne sont pas particuliers aux animaux en expérience.

COLOSTRUM D'UNE VACHE JERSYAISE

	7 MARS VÊLAGE	8 MARS MATIN	8 MARS SOIR	9 MARS MATIN	9 MARS SOIR	10 MARS MATIN	11 MARS SOIR
Matière grasse	2.65	0.50	2.40	1.70	4.02	2.10	2.80
Lactose	3.02	3.58	4.44	4.44	4.47	4.86	4.72
Matière albuminoïde	18.78	11 82	5.60	6.10	5 95	5.24	5.33
Cendres	1.10	0.90	0.67	0.86	0.80	0.80	0.75
Extrait sec	25.55	16.80	13.20	13 10	15.24	13.00	13.60

COLOSTRUM D'UNE VACHE NORMANDE

	28 FÉVRIER VÊLAGE	28 FÉVRIER MIDI	28 FÉVRIER SOIR	1er MARS SOIR	2 MARS SOIR	3 MARS SOIR	5 MARS SOIR	6 MARS SOIR
Matière grasse......	4.15	2 35	2.70	5.15	2.65	3.60	2.85	3.50
Lactose.............	2.88	3.63	4.76	4.57	4.65	4.68	4.85	4.85
Matière albuminoïde.	18.90	9.07	5.87	4.86	5.95	4.82	5.15	4.70
Cendres............	1.00	0.90	0.95	0.87	0.85	0.80	0.80	0.80
Extrait sec......	26 93	15.95	14.28	15.45	14.10	13.90	13.65	13.85

Voici enfin les analyses du colostrum de deux autres vaches. Les résultats sont dans le même sens que pour ceux qui précèdent.

A, colostrum d'une vache normande qui avait fourni jusque-là du colostrum visqueux avant le part.

B, colostrum d'une vache fémeline trois jours après le part.

	A		B	
	Susp.	Sol.	Susp.	Sol.
Matière grasse............	3.17	»	0.16	»
Lactose..................	»	2.68	»	4.28
Matière albuminoïde.......	16.99	1.17	4.16	1.15
Phosphate de chaux........	0.33	0.22	0.30	0.10
Sels minéraux.............	0.23	0.26	»	0.54
Extrait sec...............	25.05		13.69	

Si l'on compare tous ces résultats, on voit que la composition du colostrum reste à peu près la même depuis l'apparition de ce liquide jusqu'au moment du part. Dans les jours qui suivent, au contraire, elle subit des modifications très sensibles :

1° L'extrait sec diminue d'abord, puis il augmente de nouveau vers le troisième jour, pour décroître ensuite et atteindre le chiffre normal qui correspond au lait;

2° La quantité de matière grasse subit aussi des oscillations de grande amplitude avant de revenir au chiffre normal ;

3° Le lactose, d'abord en quantité faible, arrive progressivement à ses proportions habituelles ;

4° La matière albuminoïde peut atteindre, au début, près de 19 0/0; elle existe dans le colostrum à l'état de suspension et à l'état de solution; sous cette dernière forme, elle dépasse parfois le chiffre de 2 0/0;

5° A mesure que le colostrum devient du lait, la partie en suspension et la partie en solution diminuent toutes deux, mais la première beaucoup plus que la seconde;

6° Le phosphate de chaux et les autres sels sont abondants au début; on les trouve également à l'état soluble et à l'état insoluble; mais ils diminuent graduellement et cinq à six jours après le part, leur quantité est normale, et il n'y a plus d'autre sel en suspension que du phosphate de chaux[1].

A ce moment, le colostrum, dont la couleur s'est modifiée peu à peu, devient de plus en plus semblable au lait par sa composition chimique et sa réaction vis-à-vis de la présure. Il est clair, bien que l'on n'ait pas fait d'expériences sur ce sujet, que ses qualités de digestibilité sont changées.

Le colostrum, par ses transformations successives, est pour le nouveau-né le meilleur aliment de transition entre la vie fœtale et la vie extra-utérine; purgatif le premier jour, il chasse des intestins du jeune animal le méconium qui s'y était accumulé pendant la gestation. Peut-être cette faculté purgative est-elle due à une substance non encore isolée; mais on a le droit de la chercher aussi dans l'ensemble de la composition du liquide, dans sa pauvreté en lactose, sa richesse en matière albuminoïde et la nature de ses sels minéraux. Toutefois, c'est là un point qui réclame de nouvelles études.

1. M. Vaudin confirme ce résultat et le précise dans un article du *Bulletin de la Société chimique* (5 Juillet 1894), que je reçois en corrigeant les épreuves de mon article.

REVUES ET ANALYSES

MOYENS D'EXAMEN DES EAUX POTABLES

REVUE CRITIQUE

La science est soumise à un renouvellement si incessant que quelques personnes s'en effrayent ou s'en plaignent. Faudra-t-il donc toujours, disent-elles, brûler le lendemain ce que nous avons adoré la veille ? C'est à souhaiter ! pourrait-on répondre. Ce changement perpétuel d'horizon est la marque du progrès. Nous nous moquons respectueusement des opinions scientifiques de nos aïeux d'il y a cent ans. Dans cent ans, nos successeurs riront de même des nôtres.

S'ils se demandent un jour ce qu'on a pensé, dans ce siècle qui finit, au sujet des caractères des eaux potables, ils se réjouiront sans doute de trouver une belle diversité d'opinions. « Les caractères des eaux potables, dit Chaptal [1], sont les suivants : 1° une saveur vive, fraîche et agréable; 2° la propriété de bouillir facilement et de bien cuire les légumes; 3° la vertu de dissoudre le savon sans grumeaux. »

Si nous nous transportons d'un bond à l'autre extrémité du siècle, rien ne nous empêcherait de construire, avec les règles données par certains hygiénistes, une autre définition comme celle-ci : « Une eau est potable quand elle contient moins de 150 germes par centimètre cube », d'après le congrès des chimistes suisses à Fribourg en 1888, ou moins de 200, d'après MM Emmerich et Trillich [2], ou moins de 250, d'après M. C. Fraenkel [3]. Sur ce point les savants et les conseils d'hygiène sont plus ou moins *coulants*. Mais on voit combien leur conception est éloignée de celle de Chaptal en l'an V de la République française (1796) [4].

Sommes-nous plus près que lui de la vérité ? Cela n'est pas douteux. L'avons-nous atteinte, et avons-nous le droit de nous arrêter, et de nous reposer complaisamment à côté de nos plaques de gélatine? Il est sûr que non. Je voudrais même aller un peu plus loin, et, au risque de contrister les hygiénistes et les savants qui ont fait de la numération des microbes un article important de leur *Credo* scientifique, je veux essayer de montrer que ce moyen d'étude ne vaut presque rien

1. *Éléments de chimie*, 3e édition, p. 142.
2. *Anleitung zu hyg. Untersuchungen*, 2e édition, p. 220.
3. *Grundriss d. Bakterienkunde*, 2e édition, p. 353.
4. *Zur bakteriolog. Untersuch. d. Trinkwassers.* (*Centralbl. f. Bakt.*, t. X, 1891.)

par lui-même, et que c'est à tort qu'on en fait la pièce principale, parfois la pièce unique du dossier d'une eau potable.

Il y a deux choses à envisager dans la méthode : les résultats de la numération et l'interprétation de ces résultats. Sur les causes d'erreur qui peuvent fausser les chiffres relatifs au nombre des colonies, je serai bref. Ces causes d'erreur sont bien connues, et il y a des préceptes pour les éviter : il faut faire la prise d'eau dans un vase stérile, qu'on maintient dans la glace jusqu'au moment de l'utiliser; il faut que la gélatine dans laquelle on ensemence ne soit ni trop chaude, ni trop froide, ni trop salée, ni trop fade, ni trop acide, ni trop alcaline, etc. Bref, le manuel du bon bactériologiste arrive à ressembler de plus en plus à celui du bon cuisinier. Il s'agit de deviner le goût d'êtres infiniment plus délicats que nous sur leur nourriture, et qui ne savent guère répondre que par oui ou par non aux questions qu'on leur adresse.

Tout cela fait qu'on n'est jamais sûr d'eux, et que les moindres changements dans la constitution des bouillons ou des gélatines qu'on leur offre font varier dans une large mesure le nombre des colonies obtenues avec le même volume de la même eau. Les exemples de ce fait sont légion. Parmi les plus intéressants et les moins connus, il faut citer les résultats de Reinsch [1], au sujet de l'eau de l'Elbe entre Hambourg et Altona. Voici le nombre des colonies fournies par un demi-centimètre cube de cette eau suivant qu'on faisait la numération sur de la gélatine ordinaire un peu alcaline, comme le veut le rituel de la préparation, ou avec de la gélatine additionnée de proportions variables de carbonate de sodium. Ces proportions sont évaluées en dix millièmes, c'est-à-dire en milligrammes de carbonate de sodium introduits dans 10 c. c. de gélatine.

Dans la gélatine ordinaire			475	colonies.
Avec 5	dix millièmes de carbonate	de sodium.	1,140	—
— 10	—	—	2,976	—
— 20	—	—	2,486	—
— 30	—	—	1,612	—
— 50	—	—	1,302	—
— 100	—	—	348	—
— 150	—	—	216	—
— 200	—	—	74	—
— 300	—	—	0	—

On voit qu'un millième de carbonate de sodium sextuple le nombre de colonies fournies par la gélatine ordinaire. Reinsch a aussi étudié l'effet des acides, et voici, résumés comme plus haut, ceux que lui a fournis l'emploi de l'acide tartrique :

Dans la gélatine ordinaire			406	colonies.
Avec 28	cent millièmes	d'acide tartrique	340	—
— 56	—	—	173	—
— 84	—	—	19	—
— 140	—	—	6	—
— 224	—	—	0	—

De ces différences, Reinsch conclut naturellement que le degré d'acidité ou d'alcalinité de la gélatine a une importance à laquelle on ne songe pas assez, et il propose, naturellement aussi, de renforcer là-dessus l'arsenal de la science, de renoncer au papier de tournesol, moins sensible que les microbes, et de recourir à des procédés de dosage alcalimétrique plus perfectionnés. Ce serait fort bien, s'il y avait un degré d'acidité ou d'alcalinité convenant à tous les microbes : rien ne devrait coûter pour s'en rapprocher. Mais on sait fort bien que ce qui plaît aux uns déplaît aux autres. On sait aussi que ce sont de farouches intransigeants qui ne se contentent pas à demi. Dès lors à quoi bon se donner tant de peine? On ne les satisfera jamais tous. Il vaut mieux reconnaître que tous ces dénombrements sont approximatifs, qu'ils n'ont par suite tout au plus qu'une valeur de comparaison, s'ils sont bien faits, mais aucune vertu propre. Chaque numération est un coup de filet dans une rivière poissonneuse; de ce qu'il ramène, il est imprudent de conclure à ce qu'il ne ramène pas.

L'impossibité de tabler avec sécurité sur le nombre des bactéries contenues dans une eau pour savoir si elle est potable, a conduit à essayer de la numération du nombre des espèces. C'est, je crois bien, Hueppe [1] qui l'a recommandée le premier. Migula [2] l'a poussée jusqu'au fanatisme : il ne se préoccupe plus du nombre de microbes; il juge même inutile de s'opposer à leur multiplication dans la prise d'essai, par l'emploi de la glace ou autrement; il ne voit et ne veut dénombrer que le nombre des espèces. « Dédaignons, s'est-il dit sans doute, ces espèces banales, communes à toutes les eaux, et qui par là, sont sans aucun doute inoffensives. Elles forment le fond commun, la trame du dessin varié de la population microbienne. C'est ce dessin en saillle dont il faut s'appliquer à dénombrer les fils, car plus il y aura d'éléments divers entrant dans sa composition, plus il y aura chance d'y rencontrer des éléments nuisibles. »

On pourrait discuter la justesse de cette idée directrice, et elle ressortirait, je crois, de cette discussion, singulièrement boiteuse et ankylosée. Il vaut mieux faire remarquer que le dénombrement des espèces est chose extrêmement difficile, alors même qu'on prend les précautions que M. Migula dédaigne si superbement, et qu'on protège l'échantillon contre la pullulation des microbes originels et la concurrence vitale qui en résulte entre les espèces présentes. Nous avons vu que le nombre des colonies dépendait de la composition du milieu, mais cela tient en grande partie à la différence des espèces. La numération des espèces se heurte donc aux mêmes difficultés que la numération

1. *Journal für Gasbeleuchtung u. Wasserversorgung*, 1887.
2. *Centralbl. f. Bakt*, 1890.

des individus; comme elle, elle dépend en outre du temps. Toutes les espèces, de même que toutes les colonies, ne sont pas contemporaines à l'éclosion pour avoir été contemporaines à l'ensemencement. Enfin, ce n'est pas à une époque où on segmente à l'infini l'espèce du bacille cholérique, si elle existe, et où on trouve toute une série de transitions entre le *B. coli* et le B. typhique, qu'on peut venir parler gravement de la numération des espèces. Nous ne savons plus trop ce qu'il y a derrière ce mot. Est-ce un mur? Est-ce le vide?

C'est à ce moment qu'en désespoir de cause on s'est attaché à la poursuite de certaines espèces, considérées comme particulièrement suspectes ou même dangereuses. Entre tous les êtres rangés dans cette catégorie, le *B. coli* a eu la plus heureuse fortune, et c'est souvent qu'on le considère comme caractéristique de la contamination des eaux par les produits sortis du canal digestif. La crainte du *coli* est devenue le commencement de la sagesse. Ici, je sens que je dois être prudent : *Incedo per ignes*... Je n'entends contester aucune des spéculations auxquelles il a donné lieu : il y en a de bonnes, il y en a de mauvaises, il y en a qui sont à la fois bonnes et mauvaises, et le triage nous prendrait trop de temps et d'espace. J'aime mieux me demander si ce bacille n'a pas été un peu victime de sa mauvaise mine, je veux dire du nom qui lui a été donné. Je me figure que si, au lieu de le découvrir dans le canal intestinal de l'homme et des animaux [1], Escherich l'avait rencontré dans toutes les eaux, où nous savons aujourd'hui qu'il existe, et l'avait appelé *bacillus aquæ*, nous serions à ce moment plus occupés à surveiller son passage de l'eau potable dans le canal intestinal, que son passage du canal intestinal dans les eaux potables. Nous n'avons en vérité aucun droit d'accuser une contamination humaine ou animale dans les eaux qui contiennent le *B. coli communis*, tant que nous n'aurons pas démontré que c'est uniquement dans l'intestin que ce bacille se multiplie, et, comme pour le nombre des colonies, nous dirons pour le *B. coli* que sa présence dans une eau *peut être* un symptôme, mais n'est pas une preuve de contamination fécale.

En résumé, qu'on compte les individus, les espèces, ou qu'on poursuive telle ou telle famille suspecte, aucun de ces divers procédés

1. C'est à tort, en effet, qu'on regarde quelquefois ce bacille comme particulier à l'intestin de l'homme, MM. Harrisson Dyar et Siméon Keith, qui l'ont recherché dans les animaux domestiques (*Technology Quarterly*, t. VI, 1893), l'ont trouvé en abondance dans les déjections du chat, du chien, du porc et de la vache, où il se présente presque en cultures pures, et est toujours en beaucoup plus grand nombre que les autres bacilles. Il en est, comme on sait, de même pour le cobaye. Par contre, ces savants n'en ont pas trouvé dans la chèvre et le lapin; mais cela doit dépendre du mode d'alimentation, car il n'y a aucune raison pour que les microbes du canal intestinal soient toujours et partout les mêmes.

d'investigation ne donne la sécurité de jugement cherchée, et la foi qu'on peut avoir en chacun d'eux semble terriblement illusoire.

II

Mais alors, dira quelque lecteur en levant les bras au ciel, à qui et à quoi se fier? Ce scepticisme scientifique aboutit au fatalisme. Faudra-t-il donc se contenter de regarder et de laisser passer? — A Dieu ne plaise! Ce contre quoi je m'élève, c'est contre cette habitude trop répandue qui consiste à faire juger au loin des caractères d'une eau potable par un chimiste ou un bactériologiste, qui ne la connaît qu'en bouteille, et qui ne peut porter sur elle qu'un jugement incertain; c'est encore contre cette tendance à jeter par-dessus bord les méthodes anciennes, quand une nouvelle surgit, et à ne croire qu'en elle. Tout sert quand on marche dans l'obscurité, et ce n'est pas quand on aborde cette redoutable question des eaux potables qu'on a le droit de négliger le moindre indice et de faire fi des diverses indications de la science. Il faut, au contraire, lui emprunter tout ce qu'elle peut donner de garanties. J'en vois au moins trois en ce moment sur la question qui nous occupe, en attendant qu'on en découvre d'autres: celle du géologue, celle du chimiste, celle du bactériologiste. Envisageons-les séparément.

Et d'abord le géologue. Presque toutes les eaux employées à la boisson ont subi un parcours souterrain plus ou moins long, lorsqu'elles viennent alimenter la nappe des puits ou jaillir à l'extérieur sous forme de sources. Dans ce parcours, elles subissent trois ordres principaux de transformations. Elles dissolvent des matières organiques, des sels et des gaz variés : ce sont des changements d'ordre chimique. Elles se rafraîchissent ou se réchauffent : ce sont des changements d'ordre physique. Elles se chargent ou se dépouillent de germes vivants. Examinons ce dernier point en premier lieu, nous retrouverons les autres.

C'est au voisinage de la surface de la terre que les microbes sont les plus abondants. L'eau de pluie, très pure à son arrivée sur le sol, s'en charge dès qu'elle entre en contact avec les couches superficielles, et se divise en deux parties : 1° celle qui coule le long des pentes et alimente le ruissellement; celle-ci est toujours très chargée de germes 2° celle qui pénètre dans les profondeurs. Cette dernière peut avoir à son tour un sort fort divers suivant la nature du sol. Tantôt, dans les terrains perméables, elle s'arrête à quelques mètres de profondeur et y forme une nappe d'infiltration ondulée dont les reliefs et les dépressions se modèlent grossièrement sur le relief extérieur, de sorte qu'on peut l'atteindre partout en creusant un puits à peu de profon-

deur, et qu'on la voit même parfois former au fond de la vallée des suintements ou même des sources plus ou moins abondantes, comme celles qui alimentent la Vanne.

Si, dans ce trajet souterrain, l'eau d'infiltration rencontre une couche imperméable d'argile, ou de marne, ou d'une roche non fissurée, elle coule à sa surface et forme sur quelques uns des points où cette couche imperméable vient affleurer le sol, un *cordon de sources* ou un *niveau d'eaux* sur le flanc des vallées. Enfin, dans les terrains peu perméables, mais fissurés, les eaux d'infiltration suivent des trajets irréguliers, s'enfoncent dans des fentes ou des crevasses. Il n'y a plus, à proprement parler, de nappe régulière d'infiltration, mais des filets plus ou moins volumineux, pouvant s'élever quelquefois au rang de rivières souterraines, comme celle qui vient sortir par la fontaine de Vaucluse.

Nous avons dit plus haut que les eaux superficielles sont chargées de germes; les eaux de profondeur en contiennent d'autant moins qu'elles ont subi un contact plus étroit et plus prolongé avec les couches qu'elles ont traversées. Or ces eaux sont rarement tout à fait distinctes. Une source, même la plus profonde, reste toujours exposée, ne fût-ce qu'à son point d'émergence, au mélange avec des eaux de surface. Ce mélange, d'un autre côté, ne se fera pas d'ordinaire d'une façon constante. Que signifie alors la richesse bactériologique de l'échantillon d'eau examiné? Une eau pourra être pure aujourd'hui s'il fait beau, impure demain s'il pleut. Un puits pourra subir ou éviter, suivant les hasards de l'irrigation à son voisinage, l'invasion d'une quantité variable d'eaux de surface qui en feront varier en quantité et en qualité la population microbienne. Avant toute étude bactériologique, il faut donc une étude sur place, faite par un observateur bien au courant des allures générales des couches géologiques, des failles, des accidents de la région. C'est seulement ainsi qu'on peut arriver à connaître la direction générale et l'origine de la nappe d'infiltration qui alimente la source ou le puits, voir les dangers de contamination auxquels elle est exposée dans son parcours, les précautions à prendre pour éviter le mélange avec les eaux de surface, pour lui conserver intact son périmètre de protection, bref pour se renseigner sur une foule d'éléments importants dont on ne peut se faire une idée qu'en étudiant *intus et extus* la région de provenance.

Et ce n'est pas seulement de la géologie qu'il faudra faire sur les lieux. Voici un puits entouré de maisons, ou alimentant un lavoir placé dans son voisinage, ou occupant le centre d'une place souvent piétinée ou salie. Sa margelle, son revêtement de pierre sont sujets à caution, ou bien encore le sol aux alentours a été remué. Comment

s'assurer de son étanchéité? Comment se convaincre qu'il n'est pas exposé à recevoir, par moments ou constamment, un contingent d'eaux de surface? Ceci n'est plus de la géologie, c'est presque le domaine du terrassier. Quelques sondages en des points convenables donneront souvent des indications précieuses. Rien n'empêcherait en outre de recourir à l'expérience. Veut-on savoir s'il y a pénétration facile des eaux de surface dans le sol entourant la margelle d'un puits, ou avoisinant le point d'émergence d'une source. Il suffit de répandre sur la surface suspecte de l'eau fortement salée, ou encore du sel pulvérisé, sur lequel on fait tomber en pluie une quantité d'eau suffisante pour que le sol s'en imbibe.

Le sel marin a, comme on sait, la faculté de ne pas adhérer aux éléments des divers sols, ou du moins d'en être emporté facilement par l'eau qui les traverse. S'il y a communication facile entre les eaux de profondeur et les eaux de surface, on en sera averti de suite par la saveur salée que prendra l'eau du puits ou de la source, ou encore par l'augmentation du précipité sous l'action du nitrate d'argent. Je ne saurais trop recommander cette expérience simple, qui a l'avantage quand elle réussit, et elle réussit souvent, de convaincre les plus incrédules, tant elle parle par elle-même.

Une autre méthode d'investigation, très sûre aussi, mais moins rapide, repose sur l'emploi du thermomètre. Une eau qui a séjourné longtemps dans le sol, qui s'y est filtrée et purifiée de ses germes, lui a emprunté d'ordinaire une température constante. Les sources *pérennes* ne traduisent que très faiblement et à longue échéance l'influence des pluies et des saisons. Par contre, l'eau d'une source ou d'un puits, qui reçoit sans filtration suffisante une partie de la pluie tombée ou de l'eau déversée à son voisinage, s'en trouve réchauffée pendant l'été et refroidie pendant l'hiver. Les variations sont quelquefois faibles et exigent des thermomètres sensibles. Mais elles sautent aux yeux, quand on en fait une étude assez minutieuse et assez prolongée. Voilà un élément d'information précieux, et parfois très court à acquérir. Mais il ne peut encore être recueilli que sur les lieux.

En résumé, une étude locale est la préface indispensable de toute étude de captation d'eau, qu'il s'agisse d'une ville ou d'un particulier. La ville, qui est plus riche et qui a besoin de sources plus volumineuses, pourra mettre plus de soin à ces études et les faire faire par des savants plus compétents. Le particulier pourra consulter les gens expérimentés de sa région, les cartes géologiques, la marche des sources et le fonctionnement des puits dans son voisinage, faire les quelques expériences simples que j'ai indiquées plus haut. Je conviens

qu'il est beaucoup moins pénible et plus court de prendre une bouteille d'eau et de l'envoyer, à fin d'analyse, dans un laboratoire de recherches, mais il serait encore plus simple et plus court de ne rien envoyer du tout, si, comme je pense l'avoir montré l'analyse chimique ou bactériologique sont de la fantasmagorie pure, quand elles sont seules.

III

Venant après l'étude géologique, elles vont au contraire devenir très riches en enseignements. Parlons d'abord de l'analyse chimique. L'eau de pluie a emprunté aux couches terrestres qu'elle a traversées des matériaux dont l'étude peut renseigner sur son parcours souterrain, et confirme ou infirme les données géologiques. De ces matériaux, les substances organiques sont les plus importants pour nous. Il n'en a pas toujours été ainsi : c'étaient autrefois les matières minérales qui étaient les éléments essentiels du jugement à porter sur une eau potable. On se méfiait de celles qui en contenaient trop peu, parce qu'on croyait les sels de l'eau nécessaires à l'alimentation et à la construction du squelette. On rejetait les eaux qui en contenaient trop, en les accusant d'être lourdes et difficiles à digérer. Peut-être avons-nous trop facilement renoncé à ces notions, que nous traitons de préjugés. D'après ce que j'ai vu dans l'étude de la digestion, il ne me semble pas douteux que la composition de l'eau n'ait de l'influence sur cette espèce de dissociation mécanique et de gélification que nous décorons aujourd'hui du nom impropre de *digestion des matières albuminoïdes* ou de peptonisation. Mais ce n'est pas le moment d'aborder ce sujet. Tout ce que j'en veux retenir, c'est que la composition minérale des eaux potables, prisée trop haut autrefois, est prisée trop bas aujourd'hui [1].

J'en dirai autant des matières organiques, auxquelles l'école de Liebig avait donné trop d'importance, et dont on fait trop bon marché de nos jours. La matière organique est rare ou absente dans les profondeurs du sol. Elle est tout entière retenue dans les couches superficielles. Une eau qui a subi une longue filtration souterraine n'en contient presque pas, et sa présence dans une eau de source ou de puits est le témoin et la preuve d'un mélange d'eaux superficielles dans les terrasses perméables, ou au moins d'eaux insuffisamment filtrées dans les calcaires fissurés. Mais cette présence, une fois constatée, n'a de signification et d'importance que celles que lui donnent les considérations géologiques et l'étude faite sur les lieux. Dans un sol perméable et filtrant, une richesse anormale de l'eau en matière organique sera

1. Voir à ce sujet Kruse, Kritische u. exper. Beitrage z. hyg. Beurtheilung d. Wassers, *Zeitschr. f. Hyg.*, t. VII, 1894.



l'indice d'un mélange d'eaux superficielles au voisinage du griffon de la source ou aux abords immédiats du puits; dans un sol sableux grossier, dans une région calcaire sillonnée de larges fissures, c'est au contraire de loin que pourra venir cette matière organique de la surface, qu'aucune action véritablement filtrante n'aura arrêtée dans sa marche vers les profondeurs ou dans son trajet souterrain.

Cette étude quantitative des matières organiques permet donc d'ajouter une nouvelle pièce, souvent intéressante, au dossier de l'instruction. On tirerait encore plus de lumières de leur étude qualitative. Mais s'il n'est déjà pas très facile de savoir combien il y a de matières organiques dans une eau, il est presque impossible, dans l'état actuel de nos connaissances, de dire en quoi elles consistent. Tout ce qu'on peut faire, et encore assez mal, est de distinguer l'azote sous forme d'acide nitrique de l'azote sous forme d'ammoniaque, et de l'azote albuminoïde, c'est-à-dire de celui qu'on considère comme n'ayant encore subi aucune transformation depuis qu'il a quitté les tissus de l'animal ou du végétal qui l'a fourni. Si imparfaites qu'elles soient, ces notions peuvent pourtant se rendre utiles. Il n'y a qu'à se demander quelle est celle de ces trois variétés de l'azote qui a le plus de chances d'être inoffensive.

Il est clair qu'elles ne s'équivalent pas. L'azote albuminoïde n'appartient pas toujours à des matières albuminoïdes bien caractérisées; il fait quelquefois partie des peptones, des matières extractives solubles dans l'eau, des amides ou acides amidés que l'on trouve dans tous les produits de transformation de ce qui a eu vie; mais, en gros, et en laissant de côté tel ou tel argument particulier dont on pourrait se servir pour combattre la thèse générale, l'existence de cet azote dans une eau témoigne que cette eau reçoit un apport direct de matières organiques en voie de fermentation ou de putréfaction. Rien ne nous dit que ces matières soient animales ou végétales, dangereuses ou inoffensives. Nous portons d'ailleurs en nous, dans notre canal intestinal, un fumier auprès duquel l'eau la plus chargée pourrait passer comme un symbole de pureté. Les matières organiques de l'eau potable ne sont donc rien ou quasi rien par elles-mêmes. Mais elles ont une valeur symptomatique. Elles peuvent mettre sur la voie d'une cause de pollution, toujours dangereuse, même quand elle a passé longtemps inaperçue; car, en pareille matières hier ne répond pas d'aujourd'hui et de demain.

C'est à cause de leur *devenir* que les matières organiques complexes sont graves, et qu'il faut les éviter autant qu'on le peut. L'azote albuminoïde est donc un azote suspect. L'azote ammoniacal se recommande au contraire surtout à notre attention par l'histoire

de son passé. Dans l'ordre général des choses, il est le lien entre les phénomènes de destruction et de construction qui se partagent le monde. L'azote de la matière organique doit prendre l'état d'ammoniaque avant d'être amené, par les ferments nitreux et nitriques, à l'état sous lequel il est le plus facilement utilisable par les végétaux. L'ammoniaque est donc le témoin d'une fermentation ou d'une putréfaction organique *récente* ou *voisine*, qu'un hasard pourra rendre *actuelle* ou *présente*. Son existence dans une eau doit amener un sentiment d'insécurité, faire douter de la puissance filtrante de la terre, lorsqu'on ne découvre pas tout près une explication suffisante du phénomène[1], bref, faire ouvrir l'œil aux intéressés.

En revanche, l'azote nitrique, lorsqu'il est seul, est le sûr indice que toutes les transformations bactériennes ont pris fin dans les eaux, que tout ce qui est matière organique est brûlé à fond, et que l'eau a acquis son maximum de pureté et de salubrité. A cette présence des nitrates vient se joindre, comme symptôme favorable, la réapparition dans l'eau de ses gaz normaux, dans leurs proportions normales. Une eau qui contient de la matière organique contient parfois un peu d'hydrogène sulfuré, presque toujours un excès d'acide carbonique; l'oxygène y est rare ou absent ou y disparaît par le repos. L'acide carbonique a presque disparu, et l'oxygène reprend ses proportions ordinaires dans les eaux riches en nitrates. La variation de tous ces éléments solides ou gazeux fournit des documents précieux pour reconstituer l'histoire du passé d'une eau potable, et au lieu de dédaigner cette étude, comme on le fait d'ordinaire, il faut regretter qu'on ne puisse pas la pousser encore plus à fond.

IV

J'arrive maintenant à l'étude bactériologique, complément et couronnement des études qui précèdent. Je devine que le rang que je lui assigne et l'importance que je lui attribue vont faire faire la grimace à quelques-uns de ses zélateurs. Je suis sûr, en revanche, de mécontenter d'autres savants qui, pour ne pas oser dire toujours le mal qu'ils pensent d'elle, lui appliquent dans leur for intérieur un jugement encore plus sévère que le mien. Lorsque je lis dans Gœrtner la proposition suivante : « Si un puits est étanche, bien couvert, si les conditions locales sont bonnes aux alentours, et si la couche qui fournit l'eau

1. Je n'ai garde d'oublier la formation d'ammoniaque par voie purement chimique, par exemple au contact des protosels de fer. Mais cela est en dehors de mon domaine.

est assez profonde, on peut considérer comme exclue la possibilité d'une infection, malgré l'existence dans l'eau d'un grand nombre de germes[1]; » lorsque je vois M. Gruber[2] ajouter : « Lorsque les abords d'un puits sont suspects et sa bonne construction douteuse, il ne faut pas considérer comme exclue la possibilité d'une infection, malgré la présence dans l'eau d'un petit nombre de germes », il me semble bien clair que, pour ces savants, l'analyse bactériologique n'a aucune valeur, et que tout le problème est dans l'étude des circonstances locales.

Je crois, au contraire, que cette étude locale une fois faite et aussi complète que possible, comme elle ne peut pas être parfaite et laisse nécessairement des points douteux, il est utile de la compléter par une analyse bactériologique, mais non par une analyse dans laquelle on se borne à la numération de colonies dans un échantillon puisé presque au hasard. Je voudrais que le moment et le lieu de la prise d'échantillon s'inspirent des données fournies par l'étude locale, qu'au besoin il y en ait plusieurs, prélevés dans diverses circonstances atmosphériques, et représentant chacun une des phases possibles dans la région des eaux d'alimentation de la source ou du puits, ou même — pourquoi pas? — de la rivière ou du fleuve, car je crois avoir montré dans une Revue précédente qu'on a tort de repousser *a priori*, comme on le fait trop souvent, l'eau des rivières du service de l'alimentation. Le cours d'une rivière est bien plus facile à surveiller que celui d'une nappe d'eau souterraine, et dans l'une comme dans l'autre, les causes de purification fonctionnent à côté des causes de contamination.

C'est la prise de l'échantillon qui donne à l'analyse bactériologique, même faite par des procédés imparfaits, à la condition qu'ils soient toujours les mêmes, son caractère et sa valeur. Imaginez que le nombre des germes contenus dans une eau augmente après les pluies et diminue avec la sécheresse. Voilà de quoi faire soupçonner une invasion intermittente des eaux superficielles, et si on observe en même temps des variations concomitantes dans le débit ou la température de la source, en voilà assez pour établir un jugement général, soit sur la qualité filtrante générale du sol qui alimente la couche, soit sur l'existence de fissures ou de poches, en accord ou en désaccord avec la caractère géologique de la région. Que signifierait alors une seule analyse, faite au hasard? Si elle fournit un grand nombre de germes, on est exposé à condamner par là une eau d'ailleurs salubre et momen-

1. Tiemann-Gartner, Die chemische u. mikvoskopish-bactériol., Untersuchung des Wassers, 1889.

2. Max Gruber, Grundlagen d. hyg. Beurtheilung des Wassers. (*Deutsches Vierteljahrschrift, f. offent. Gesundheitspflege*, 1894.)

tanément envahie. Si elle donne l'eau comme pure, elle inspire une sécurité qui peut être trompeuse. L'histoire de la récente épidémie typhoïque à Paris tient à ce qu'on a cru trop aveuglément à la puissance filtrante du sol qui alimente les sources, à ce qu'on n'a pas fait assez d'attention aux circonstances locales qui peuvent à un moment donné produire une contamination.

Quand il s'agit de puits, les incertitudes de l'analyse bactériologique, réduite à ses propres forces, sont encore plus manifestes. On se rappelle tout ce qui a été écrit au sujet de la difficulté de trouver dans un puits des échantillons d'eau contenant un nombre à peu près constant de germes, et donnant une idée de la pureté moyenne du contenu. Il y en a sur lesquels on a attelé de puissantes pompes à vapeur, et dont on a extrait des centaines et des milliers de mètres cubes, sans pouvoir réduire à zéro la richesse en germes de l'eau extraite. Quel jugement porter sur eux, si on consulte seulement l'analyse bactériologique? Il aurait fallu condamner et écarter de l'alimentation la totalité des puits existants, si on avait exigé de l'eau privée de germes, et une des raisons qu'on faisait valoir en faveur de ces chiffres minimums de 100, de 150, de 250 germes par centimètre cube, était qu'avec ces minimum, on n'excluait que 1/10, 1/5 des puits de la région. Tout récemment, Migula (*loc. cit.*) dans son plaidoyer en faveur de l'étude du nombre des espèces microbiennes, substituée à celle du nombre des germes microbiens, faisait valoir comme argument qu'en acceptant un minimum de *dix* espèces par centimètre cube, on n'éliminait que 1/8 des eaux analysées, tandis qu'on en éliminait les 9/10 par l'étude du nombre de germes. Quand une méthode en est arrivée à de pareilles bizarreries de doctrine, on peut assurer qu'elle est sortie du bon chemin, et la cause en est évidemment ici que l'analyse bactériologique a voulu vivre de sa propre vie, et se désintéresser de tout ce qui n'était pas elle.

Quoi d'étonnant à ce que chaque puits ait sa physionomie propre? Même quand il est couvert, il y pleut constamment des poussières et des corps solides. Même quand il est bien maçonné, ses parois se couvrent de plantes ou de mousses et s'égouttent dans son eau. Il est d'ordinaire tapissé sur son fond d'une couche de boue visqueuse que l'aspiration de la pompe ou les mouvements du seau ne troublent pas, mais qui entre en suspension si on épuise l'eau. En plus, ce puits s'alimente d'ordinaire au moyen d'une couche d'eaux souterraines sans cesse en mouvement, mais dont toutes les parties ne prennent pas également part à l'alimentation. En abaissant le plan d'eau, on appelle dans le puits des couches qui n'y arrivaient pas auparavant et qui ne sont pas nécessairement identiques à celles qui l'alimentaient. Enfin ces dernières, celles qui maintiennent le puits à son niveau ou y font

monter ou baisser l'eau suivant les saisons, ne sont pas nécessairement toujours les mêmes, et l'échantillon d'eau recueilli à un moment ne pourra rien dire pour celui du lendemain ou de la veille. De là résulte que pour les puits, encore plus que pour les sources, l'étude locale doit primer de beaucoup l'étude bactériologique. Celle-ci ne pourra fournir qu'un document de plus pour démontrer ou confirmer tel ou tel fait que l'enquête sur les lieux aura laissé inconnu ou douteux. Quant à la prétention de juger de la valeur d'une eau de puits, en tâchant d'y découvrir un échantillon moyen, de richesse bactériologique constante, c'est, toute proportion gardée, vouloir épuiser la Méditerranée pour juger de la composition moyenne de tous les fleuves qui s'y jettent. C'est, non pas dans le puits, mais à ses abords qu'il faut faire l'étude de l'eau qu'il contient.

Il est, je crois, inutile d'entrer plus avant dans le détail. Il faudrait le faire infini pour le plier à la diversité des faits qui peuvent se présenter. Il nous suffit d'avoir résumé, dans les pages qui précèdent, les règles qui doivent présider aujourd'hui à l'étude d'une eau potable. Elles pourront paraître compliquées. Nous répondrons que l'ampleur à donner à l'enquête est naturellement en rapport avec l'importance des intérêts à desservir, et que si une capitale, une ville, peuvent et doivent nommer des commissions compétentes et recourir à des études coûteuses, quand il s'agit de distribuer à leurs habitants une eau de bonne qualité, pouvant entrer sans traitement nouveau dans l'alimentation courante, un particulier qui ne voudra pas ou ne pourra pas faire ces études peut s'en dispenser en installant, suivant les cas, chez lui, un filtre à charbon ou un filtre à terre poreuse, ou un filtre en porcelaine ou un service de stérilisation de l'eau.

La question n'est d'ailleurs pas là. Il ne s'agit pas de savoir si l'emploi de ces moyens est difficile, mais de savoir si l'un d'eux, même le plus parfait, donne autant de sécurité que leur ensemble. Là dessus, je le reconnais, les avis se partageront. Les uns reconnaîtront le bien fondé de nos observations et entreront dans ces voies nouvelles. D'autres n'éprouveront aucun besoin d'innover. D'autres enfin, d'humeur plus joyeuse, se diront qu'il vaut mieux se croiser les bras et vivre tranquille du moment qu'aucune précaution ne donne une sécurité absolue. Pour les uns comme pour les autres, il n'y a qu'à résumer tout ce qui précède en disant que la science nous fournit toute une série d'obstacles à placer sur le trajet possible des causes de contamination de l'eau. C'est à nous de les utiliser dans la mesure de nos préoccupations ou des possibilités. Plus nous en mettrons, plus notre sécurité sera grande. En tout cas, ce que j'ai essayé de prouver, c'est que si aucun d'eux, envisagé à part, ne mérite la con-

fiance qu'on lui a accordée ou qu'on lui accorde encore, on peut, en les réunissant, en faire un véritable rempart.

E. Duclaux.

INSTITUT PASTEUR

Personnes mortes de la rage après traitement.

Pialut Huberte, 56 ans, rentière à Neuilly, mordue le 31 décembre 1893 par un chien que M. Bouscatel, vétérinaire à Neuilly, a reconnu atteint de la rage ; traitée à l'Institut Pasteur du 3 au 17 janvier 1894.

Deux morsures siégeaient sur la face dorsale du pied droit et au-dessous de la malléole externe droite ; elles avaient été faites au travers d'un fort chausson qui avait été troué ; deux autres morsures siégeaient sur le 4e doigt de la main droite.

Les plaies avaient été cautérisées à l'ammoniaque 24 heures après l'accident ; les premiers symptômes rabiques se sont manifestés vers le 8 avril 1894, la mort est survenue le 10.

Oakes Hensch, 3 ans, de Shawforths (Angleterre), mordu le 31 mai 1894, traité à l'Institut Pasteur du 5 au 24 juin. Le chien mordeur avait été reconnu enragé par un vétérinaire.

Les morsures au nombre de 8, toutes pénétrantes, siégeaient sur la périphérie du bras gauche : elles avaient été faites sur le membre nu et avaient été cautérisées au nitrate d'argent au bout de 10 minutes environ.

Le jeune Oakes est mort le 29 juin.

Personne morte après traitement d'une affection autre que la rage.

Robert Joseph, 8 ans, de Bougie, mordu le 4 octobre 1893, traité à l'Institut Pasteur du 10 au 28 octobre. Le chien mordeur avait été reconnu enragé par M. Senac, vétérinaire à Bougie.

Les morsures au nombre de 10, toutes pénétrantes, siégeaient à la main droite, à l'avant-bras droit et au tiers supérieur de la cuisse gauche, les habits avaient été déchirés. Les plaies avaient été lavées à l'ammoniaque au bout de 5 minutes.

Le jeune Robert a succombé le 16 février à des accidents nerveux ne rappelant pas la rage. La mort est survenue 6 heures après l'apparition des premiers symptômes.

STATISTIQUE DE L'INSTITUT PASTEUR

AVRIL, MAI, JUIN 1894

	A			B			C		
Morsures à la tête et à la figure — simples	»	2	5	»	9	18	»	1	5
— multiples	»	3		»	9		»	4	
Cautérisations efficaces	»	»	»	»	»	»	»	»	»
— *inefficaces*	3	»	»	3	»	»	2	»	»
Pas de cautérisation	2	»	»	15	»	»	3	»	»
Morsures aux mains — simples	»	17	28	»	46	97	»	35	77
— multiples	»	11		»	51		»	42	
Cautérisations efficaces	»	»	»	1	»	»	»	»	»
— *inefficaces*	8	»	»	38	»	»	36	»	»
Pas de cautérisation	20	»	»	58	»	»	41	»	»
Morsures aux membres et au tronc — simples	»	10	17	»	34	85	»	25	70
— multiples	»	7		»	51		»	45	
Cautérisations efficaces	8	»	»	»	»	»	»	»	»
— *inefficaces*	6	»	»	38	»	»	40	»	»
Pas de cautérisation	11	»	»	47	»	»	30	»	»
Habits déchirés	13	»	»	64	»	»	21	»	»
Morsures à nu	4	»	»	21	»	»	49	»	»
Morsures multiples en divers points du corps	»	»	4	»	»	10	»	»	1
Cautérisations efficaces	»	»	»	»	»	»	»	»	»
— *inefficaces*	»	»	»	1	»	»	1	»	»
Pas de cautérisation	4	»	»	7	»	»	»	»	»
Habits déchirés	»	»	»	»	»	»	»	»	»
Morsures à nu	4	»	»	8	»	»	1	»	»
Totaux. — Français et Algériens		41	54		24	210		130	153
— Etrangers		13			186			23	
		A			B			C	
TOTAL GÉNÉRAL					417				

Les animaux mordeurs ont été : chats, 18 fois ; chiens, 399 fois.

Le Gérant : G. MASSON.

Sceaux. — Imprimerie Charaire et Cie.

8me ANNÉE AOUT 1894 N° 8.

ANNALES

DE

L'INSTITUT PASTEUR

RECHERCHES SUR LE CHOLÉRA ET LES VIBRIONS

PAR EL. METCHNIKOFF,

Chef de service à l'Institut Pasteur.

QUATRIÈME MÉMOIRE

SUR L'IMMUNITÉ ET LA RÉCEPTIVITÉ VIS-A-VIS DU CHOLÉRA INTESTINAL

AVEC LA PLANCHE XI

I

SUR L'IMMUNITÉ LOCALE.

Depuis qu'il est bien établi que le choléra asiatique est une maladie due à l'invasion du vibrion de Koch, un problème nouveau s'est posé devant les savants, c'est celui d'expliquer, par la théorie du bacille-virgule, certains faits épidémiologiques qui ne s'accordent guère avec elle, et ont même servi d'arguments pour la combattre.

On a été depuis longtemps frappé par le fait que certaines localités sont si favorables au choléra que celui-ci s'y installe d'une façon endémique ; d'autres manifestent, au contraire, une immunité telle, que, malgré l'importation fréquente de germes cholériques, la maladie n'y prend jamais la forme épidémique.

D'un autre côté, on a remarqué que, même dans les pays d'endémie, il y a toujours un grand nombre d'individus possédant l'immunité, et ce fait se trouve en parfait accord avec cet autre résultat de l'expérience, que l'homme peut ingérer des quantités considérables de vibrions cholériques sans prendre e choléra. Cette observation n'a pas été faite seulement sur des

personnes qui ingéraient des vibrions cholériques dans des localités accessibles à la maladie, mais en dehors de la période épidémique. M. Wall, médecin de l'armée anglaise des Indes, a absorbé à quatre reprises des vibrions de Koch à Budapest, en 1892, lors de l'épidémie du choléra. Après cette ingestion, il eut quelquefois des selles molles, sans aucune indisposition ou malaise [1]. La présence des vibrions cholériques dans les déjections des personnes saines n'est pas un fait rare. Enfin, des recherches nombreuses, bien connues, ont démontré le peu de sensibilité des animaux de toute sorte vis-à-vis du virus cholérique. Même les singes se sont montrés réfractaires.

La nature nous montre donc toute une série d'exemples d'immunité contre le choléra, et nous indique ainsi la voie dans laquelle il faut entrer pour étudier l'épidémiologie de cette maladie.

Commençons d'abord par l'immunité locale. Est-ce que certains endroits, indemnes vis-à-vis du choléra, le sont grâce à une composition particulière du milieu, qui empêche la pullulation du germe spécifique? A l'époque où on supposait que le vibrion de Koch, pour donner le choléra, devait passer à l'état de spore, on pouvait penser que certaines conditions extérieures étaient indispensables pour développer ce stade résistant. Mais, depuis qu'il a été établi que le microbe cholérique peut vivre longtemps en dehors de l'organisme, et passer dans les intestins à l'état végétatif de vibrion, l'hypothèse des spores est devenue caduque.

Après que M. Blachstein [2], au printemps de 1893, à une époque où il n'y avait de choléra ni à Paris ni dans la banlieue, eut fait la découverte du vibrion cholérique dans l'eau de la Seine, puisée à Paris (au Point-du-Jour), je priai M. Sanarelli [3] de continuer ces recherches, interrompues par le départ de M. Blachstein. Ce dernier avait trouvé le vibrion dans des conditions telles qu'il ne pouvait subsister aucun doute sur l'importance de sa découverte. Des plaques de gélatine, ensemencées avec de l'eau de Seine conservée dans un bocal pour l'étude des

1. Cité par M. Drasche : Ueber den gegenwartigen Stand der bacillären Cholerafrage. p. 61.
2. *Ann. de l'Inst. Pasteur*, 1893, p. 691.
3. *Ibid*, p. 693.

microbes, ont donné plusieurs cultures liquéfiantes ressemblant à celles du vibrion cholérique. On était si loin de supposer la présence de ce microbe que M. Blachstein pensa d'abord avoir affaire à un coccus ; mais l'étude microscopique lui révéla la véritable nature des colonies. L'examen comparatif démontra qu'elles avaient la plus grande ressemblance avec celles du vibrion cholérique de Courbevoie, et je pus facilement constater que mes cobayes, vaccinés contre la péritonite cholérique, l'étaient aussi contre le vibrion du Point-du-Jour.

M. Sanarelli a pu confirmer cette découverte. Il a retrouvé des vibrions cholériques dans l'eau de Seine, près de Saint-Cloud, où il n'y avait pas d'épidémie, et même dans l'eau de Seine qui alimente Versailles, une des localités classiques pour leur immunité contre le choléra.

Pendant presque toutes les épidémies cholériques en France, il y a eu des cas à Versailles : toujours ils restèrent isolés, et ils n'amenèrent jamais une extension tant soit peu importante de la maladie. Lors des premières endémies (1832-1865), l'immunité naturelle de Versailles était déjà bien manifeste ; elle a encore été confirmée dans ces vingt dernières années. En 1873, il n'y a eu que 3 morts ; en 1884 pas un seul cas, et en 1892 trois décès cholériques, dont l'histoire a été déjà citée par M. Sanarelli [1]. Et cependant Versailles est loin d'être irréprochable au point de vue hygiénique ; une partie de son eau d'alimentation provenait (jusqu'à l'automne de 1893) de la Seine, et était prise en aval de Paris et de sa banlieue, souvent éprouvée par des épidémies cholériques. Cette eau, qui coulait dans un aqueduc de grande longueur, était souvent infestée par des mollusques qui mouraient dans la conduite, et rendaient l'eau parfois si dégoûtante que les consommateurs ne cessaient de s'en plaindre.

Eh bien ! dans ces conditions, et tout près d'un foyer cholérique comme Paris, Versailles restait indemne. Cette immunité n'est pas due à l'impossibilité pour le vibrion cholérique de vivre dans l'eau d'alimentation de Versailles, puisque ce vibrion y a été retrouvé par M. Sanarelli. Mais est-ce bien le vibrion du choléra ? On sait que dans ces dernières années on a découvert un grand nombre de vibrions très semblables à celui de Koch,

1. Les données précises sur l'immunité de Versailles ont été fournies par MM. Proust, Netter et Thoinot, dans la *Revue d'hygiène*, 1893, p. 587.

et que la question du diagnostic spécifique de ce microbe est devenue des plus difficiles. Les règles établies par M. Koch en 1884 et même en 1893 ne sont plus applicables aujourd'hui. Les caractères qui paraissaient d'abord constants et stables sont au contraire des plus variables. Voilà pourquoi, même dans les meilleurs laboratoires bactériologiques, dans celui de M. Koch lui-même, on a dû plusieurs fois déclarer cholériques des vibrions qui auparavant n'étaient pas considérés comme tels, et inversement. L'histoire des vibrions de Massaouah et d'Ivanoff est connue de tout le monde.

Persuadé de l'instabilité des caractères spécifiques des bactéries en général et du vibrion cholérique en particulier, je ne pouvais me fier aux propriétés si bien étudiées par M. Sanarelli. Par sa forme extérieure, l'aspect des cultures (liquéfaction typique de la gélatine, formation du voile sur la surface des milieux liquides, etc.), par sa réaction indol-nitreuse et sa propriété de produire la péritonite cholérique chez des animaux, le vibrion de Versailles se présentait comme un vrai vibrion cholérique de l'origine la plus authentique. La question principale n'était même pas de savoir si le vibrion de Versailles appartenait ou non à l'espèce cholérique, mais bien s'il était cholérigène pour l'homme.

Grâce au bienveillant concours de plusieurs de mes amis, auxquels j'exprime toute ma gratitude, cette question a pu être résolue d'une façon définitive. J'ai vu que les cultures du vibrion de la Seine, isolé par M. Sanarelli de l'eau d'une des fontaines de la place Hoche, à Versailles, agissent sur l'homme comme des cultures vibrioniennes provenant des selles cholériques. Seulement, édifié par mes expériences du printemps de 1893, je ne procédai qu'avec la plus grande prudence à cette recherche. Ainsi, je ne donnai jamais que de petites quantités de cultures. Deux personnes ont bu à jeun, mais sans alcalinisation préalable du suc gastrique, 1/88 de culture sur gélose, développée pendant 22 h. 1/2 à 36°, et diluée avec un peu de bouillon. Une goutte de cette émulsion a été versée dans de l'eau et répartie dans deux verres. L'effet de ce breuvage fut absolument nul. Trois autres personnes, ayant absorbé une quantité double de vibrions de Versailles dans les mêmes conditions, n'éprouvèrent également aucun trouble. Mais une sixième personne,

qui a avalé à jeun et sans neutralisation préalable de l'acidité gastrique, 1/44 de la même culture, a été prise de diarrhée. Celle-ci s'est déclarée de 36 à 40 heures après l'absorption des vibrions, elle s'est maintenue pendant deux jours. Les selles, très liquides, étaient tout le temps colorées et renfermaient une grande quantité de spirilles très minces, et une quantité notable de vibrions tout à fait identiques avec ceux de la culture absorbée. Des particules prises dans les déjections, et semées dans l'eau peptonisée additionnée de 2 0/0 de gélatine, ou ensemencées directement sur des plaques de gélatine à 10 0/0, ne tardèrent pas à donner des cultures du vibrion de Versailles (Seine) de Sanarelli. Dans des tubes d'eau peptonisée, il se formait le voile caractéristique, composé d'une culture pure du vibrion, tandis que sur des plaques de gélatine se développaient, à côté des vibrions, des colonies assez nombreuses du *Bacillus coli*.

Cette expérience, confirmant une de celles de M. Hasterlik, démontre que le microbe cholérique peut traverser à l'état de vibrion l'estomac non neutralisé et se multiplier dans le tube intestinal. Seulement, dans l'expérience de Vienne, ce résultat a été obtenu avec une culture de 3 jours sur gélatine, absorbée presque en entier, tandis que, dans le cas que je viens de décrire, la quantité des vibrions était de beaucoup inférieure. Cette expérience prouve en même temps la propriété du vibrion de Versailles de provoquer la diarrhée liquide chez l'homme.

Six autres personnes avaient absorbé des cultures de ce vibrion après neutralisation préalable de l'acidité gastrique par une solution de bicarbonate de soude (1 gramme par personne). Tous ont eu une diarrhée bénigne, mais plus ou moins forte. M. L... absorbe à jeun, après une dose de 1 gramme de bicarbonate de soude, une goutte de culture du vibrion de Versailles, développée pendant 20 heures à 36° dans un liquide composé de 100 parties d'eau, 2 de gélatine, 1 de peptone et 1 de sel marin. Après avoir été retirée de l'étuve, la culture était restée pendant six jours à la température de 15° environ. Le lendemain se déclara la diarrhée, qui persista pendant quatre jours. Les selles étaient très liquides, mais colorées en jaune, et renfermaient une grande quantité de vibrions de Versailles, comme d'habitude très minces. Il a été très facile d'obtenir de ces déjections des cultures pures des vibrions.

Dans cinq autres expériences de cette série, les vibrions de Versailles, cultivés sur gélose pendant 21 heures à 36°, et maintenus pendant 5 jours à 15°, furent absorbés en proportions plus grandes, jusqu'à 1/8 de la culture originelle. La personne qui avala cette quantité maxima n'eut qu'une diarrhée de courte durée. L'appétit et l'état général restèrent inaltérés. 3 autres personnes, qui absorbèrent 1/12 de culture, eurent une diarrhée liquide, mais colorée, d'une durée de 1 à 7 jours. Les déjections renfermaient des vibrions de Versailles, qui pouvaient être isolés en culture pure. La dernière personne de cette catégorie, M. A..., a eu la diarrhée riziforme, qui se déclara à peu près 50 heures après l'absorption de 1/12 de culture (précédée de 1 gramme de bicarbonate de soude) et dura 3 jours. Cette diarrhée cholériforme n'était accompagnée ni de vomissements, ni de crampes. Les déjections renfermaient des spirilles très minces et des vibrions typiques de Versailles.

La nature cholérigène de ce vibrion a été définitivement démontrée dans le cas suivant : 2 gouttes d'une émulsion obtenue en délayant dans du bouillon une culture sur gélose, développée pendant 20 heures à 36° et maintenue pendant 10 jours à la température de 15-17°, ont provoqué une petite attaque de vrai choléra. Les vibrions ont été absorbés à jeun, immédiatement après l'ingestion d'un gramme de bicarbonate de soude. Le lendemain se déclara une diarrhée abondante, qui prit bientôt le caractère riziforme; quelques vomissements et quelques crampes, l'anurie et l'hypothermie (jusqu'à 36,5 dans le rectum) complétèrent le tableau classique. Les vomissements et les crampes ne durèrent que pendant quelques heures, tandis que la diarrhée persista pendant 3 jours, mais changea de caractère : les selles redevinrent colorées et plus consistantes. Il est à remarquer qu'une autre personne, qui a absorbé une goutte de la même émulsion et exactement dans les mêmes conditions, n'a pas eu le moindre trouble. La santé persista à être bonne et les déjections restèrent normales.

Le doute n'est donc pas possible. Le vibrion de l'eau de Seine de Versailles est le vibrion cholérique, et l'immunité de cette ville ne peut être expliquée par l'impossibilité pour le microbe spécifique de vivre dans cet endroit indemne.

Les eaux de Versailles sont en général très riches en

vibrions. M. Sanarelli a isolé un vibrion de l'eau des étangs, qui liquéfie la gélatine, mais ne donne pas de réaction indol-nitreuse. J'ai commencé mes études sur l'eau dans l'automne de 1893, mais je n'ai pu retirer alors des eaux de Versailles que deux vibrions incurvés ne liquéfiant pas la gélatine. Ils étaient très nombreux dans les eaux de consommation, mais n'étaient pas du tout pathogènes pour l'homme. Quatre personnes qui ont absorbé, après neutralisation de l'acidité gastrique, jusqu'à 1/5 de culture de ces vibrions sur gélose, n'ont éprouvé aucun effet.

Le résultat principal des expériences avec le vibrion de Versailles (Seine) a pu être confirmé par les recherches sur le vibrion de Saint-Cloud, isolé également de l'eau de la Seine par M. Sanarelli dans l'été de 1893. Ici, il s'agit d'une localité (Sèvres Saint-Cloud) qui n'a pas l'immunité constante de Versailles, mais qui a été épargnée en 1892, sans parler de l'année 1893, où le choléra asiatique, confirmé par l'examen bactériologique, n'a été constaté aux environs de Paris que dans un seul cas, survenu à Saint-Denis. Cette constatation a été faite par M. Netter [1], qui a vainement cherché des bacilles-virgules dans tous les autres cas suspects. J'ai déjà mentionné dans mon second mémoire que les malades de Paris, atteints d'affections cholériformes et entrés en 1893 à l'hôpital Necker, n'ont pas eu non plus le vrai choléra, comme j'ai pu m'en assurer moi-même par des recherches bactériologiques.

L'étude du vibrion de Saint-Cloud se rapporte donc à un cas d'immunité locale temporaire. Ce microbe, dont la grande virulence pour les animaux a déjà été signalée par M. Sanarelli, est également virulent pour l'homme. Les expériences que j'ai faites ont été exécutées de la façon suivante. Le vibrion était cultivé sur gélose dans l'étuve à 35-36° pendant un ou quelques jours, après quoi les cultures étaient maintenues pendant plusieurs jours au laboratoire à 15-17°. Avant de m'en servir, je préparais une émulsion des vibrions dans du bouillon, de sorte que chaque culture était répartie dans un volume de 45 à 50 gouttes. Une ou plusieurs gouttes du mélange étaient versées dans un verre d'eau et avalées à jeun. Les personnes qui ont bien voulu absorber ces cultures, comme celles qui ont bu les vibrions de Versailles, n'étaient pas les mêmes qui

1. Voir plus loin dans ce même numéro, p. 590.

s'étaient prêtées aux recherches du printemps de 1893 (décrites dans mon second mémoire).

Sur sept personnes qui ont (après neutralisation de l'acidité gastrique avec une solution d'un gramme de bicarbonate de soude) bu des vibrions de Saint-Cloud, deux seulement ont eu de la diarrhée, et cela après l'absorption de 3 et 4 gouttes de l'emulsion mentionnée. Les 5 autres, qui n'avaient absorbé que 1 à 2 gouttes, n'ont éprouvé aucun malaise.

Dans les deux cas où les vibrions ont manifesté leur action, la diarrhée s'est déclarée le lendemain du jour où les cultures furent absorbées. Chez la première personne, M. C.., qui avait pris 4 gouttes d'une culture ensemencée 40 jours auparavant, développée à 35° pendant 3 jours, et maintenue le reste du temps à la température de la chambre, la diarrhée assez faible dura pendant 7 jours. Le nombre des déjections ne dépassait pas 3 par 24 heures. Les selles liquides, mais couleur d'ocre, ensemencées sur des plaques de gélatine, donnèrent des colonies nombreuses du vibrion de Saint-Cloud à côté du *B. coli.* Cette diarrhée légère n'était compliquée d'aucun autre symptôme cholérique.

Une autre personne, M. P.., absorba 3 gouttes de la même émulsion. Il se développa également une diarrhée légère qui dura pendant 5 jours. A l'acmé de cette indisposition, M. P.. a éprouvé des nausées et a eu quelques vomissements. Mais tout le temps l'état général est resté satisfaisant. Les déjections étaient très liquides les premiers jours, mais colorées et exhalaient une odeur fécaloïde. Dans l'eau peptonisée et gélatinisée à 2 0/0, les selles, cultivées à 36°, donnèrent des voiles composés presque uniquement de vibrions de Saint-Cloud. Sur des plaques de gélatine, ces microbes se développaient également, mais en moindre quantité.

Cinq personnes, qui ont bu à jeun 1 à 2 gouttes des émulsions en bouillon du vibrion de Saint-Cloud, mais sans neutralisation de l'acidité gastrique, n'ont éprouvé aucun trouble.

Quoique le vibrion de Saint-Cloud se soit montré beaucoup moins offensif pour l'homme que celui de Versailles (Seine), il est néanmoins incontestable qu'il est aussi cholérigène [1]. Des

1. Il est à noter que le vibrion de Saint-Cloud, très pathogène pour les animaux des laboratoires en général, l'est aussi pour le pigeon (v. *Sanarelli*, l.

bacilles-virgules, isolés des selles cholériques, et ingérés en quantité beaucoup plus considérable, ont le plus souvent provoqué des symptômes tout aussi légers que ceux causés par le vibrion de Saint-Cloud.

Les faits, exposés dans ce chapitre, permettent de tirer plusieurs conclusions. Ils prouvent d'abord que le *vibrion cholérique peut pulluler dans les eaux, y persister plusieurs mois après la cessation de l'épidémie, et conserver dans ce milieu la puissance de donner le choléra.* Ce résultat confirme pleinement les données épidémiologiques d'après lesquelles l'eau sert souvent de véhicule au vibrion du choléra asiatique. D'un autre côté il démontre que *la présence de ce microbe dans l'eau n'implique nullement l'apparition du choléra.*

Ces conclusions peuvent jeter une lumière sur d'autres faits relevés à propos des vibrions des eaux. Dans le travail le plus complet sur la matière, celui de M. Dunbar à Hambourg[1], nous trouvons la description d'un grand nombre de vibrions semblables à celui du choléra (*Choleraahnliche Vibrionen*). M. Dunbar les a retrouvés dans les eaux et la vase de l'Elbe à Hambourg jusqu'en novembre et décembre 1893, c'est-à-dire après la cessation de l'épidémie. Il les a découverts même dans l'Elbe, près du port d'Auguste, à Dresde, dans une ville réputée pour son immunité contre le choléra. Mais, comme M. Dunbar n'a pas cherché l'effet de ces vibrions sur l'homme, et comme tous les caractères de ces microbes sont très variables, il hésite à les donner comme cholériques. Après les expériences avec les vibrions de Versailles (Seine) et Saint-Cloud, il devient très probable que les vibrions de M. Dunbar, ou au moins un certain nombre d'entre eux, sont de vrais microbes cholériques.

Dans tous les cas, *on doit admettre comme certain que le vibrion du choléra-morbus peut pulluler dans les eaux des localités constamment ou temporairement indemnes contre cette maladie, et que par conséquent l'immunité locale ne peut être expliquée par l'impossibilité où serait le microbe spécifique de vivre dans ces localités*[2].

c. p. 723). Ce fait confirme l'opinion des auteurs (MM. Gamaleïa, Sawtchenko, Salus, etc.) qui admettent que certains vibrions cholériques sont très virulents pour le pigeon.

1. *Arbeiten a. d. k. Gesundheitsamte*, V. IX, 1894, p. 379.

2. Cela ne veut nullement dire qu'il n'y ait pas sur le globe des points où le vibrion cholérique ne pourrait trouver des conditions absolument défavorables pour son existence.

II

LE POUVOIR PRÉVENTIF DU SANG DES HABITANTS DES LOCALITÉS INDEMNES CONTRE LE CHOLÉRA.

Les données du précédent chapitre se trouvent en parfaite harmonie avec les résultats des expériences sur l'homme, rapportés dans mon second mémoire (ces *Annales*, 1893, p. 562). *La réceptivité de l'homme pour le choléra n'a aucun rapport constant avec la virulence du vibrion cholérique pour les animaux de laboratoire.* Le premier cas de choléra expérimental humain a été provoqué par un vibrion, isolé en 1884, et presque entièrement dépourvu de virulence pour les animaux en général et le cobaye en particulier. Le vibrion de Saint-Cloud, plus virulent pour les animaux que celui de Versailles, s'est montré moins actif sur l'homme. Dans le second cas de choléra provoqué chez l'homme, la maladie a été produite par une petite dose de culture âgée de 11 jours. Or on sait que, pour les animaux, ce sont les cultures fraîches de 1 à 2 jours qui sont virulentes. A partir du troisième jour, cette virulence s'abaisse progressivement. D'un autre côté, l'homme peut impunément avaler des quantités considérables de vibrions cholériques frais ou développés pendant un temps assez long. C'est en visant ces faits que j'ai exprimé, à la fin de mon deuxième mémoire, cette hypothèse que pour que le choléra se produise, il faut une sensibilité particulière de l'organisme humain, sensibilité dont les éléments nous sont inconnus.

Il ne s'agit pas ici d'une prédisposition à l'indigestion, mais bien de quelque chose de particulier. M'appuyant sur cette supposition, j'ai exposé (*l. c.*, p. 587) une sorte de programme de recherches ultérieures sur l'action des sucs digestifs, des éléments cellulaires de l'organisme, et des microbes du canal digestif, sur le vibrion cholérique et ses produits toxiques.

Mais, avant d'aborder ce sujet délicat et compliqué, j'ai dû résoudre le problème suivant. Est-ce que dans l'immunité locale, permanente ou temporaire, développée à la suite d'une épidémie cholérique, la vaccination produite inconsciemment par l'ingestion des vibrions si répandus dans les eaux, ne jouerait pas un rôle? Comme la virulence de ces microbes est très variable, il

pourrait peut-être se trouver parmi eux des vibrions vaccinant l'organisme contre l'effet pathogène du virus cholérique.

L'étude des eaux de consommation de Lyon et de Genève (dont je dois les échantillons à l'obligeance de MM. Kelsch et Massol), faite en automne et en hiver 1893, m'a démontré que les habitants de ces villes absorbent quantité de vibrions. Seulement les formes que j'ai pu isoler, dans cette saison avancée de l'année, appartenaient à des vibrions ne liquéfiant pas la gélatine, ne donnant pas la réaction indol-nitreuse (quoique producteurs de nitrites), et ne présentant qu'une faible virulence pour le cobaye. Ces vibrions étaient dépourvus de tout pouvoir pathogène pour l'homme. Ainsi, de six personnes qui ont absorbé jusqu'à 3/8 de culture du vibrion de Lyon sur gélose, aucune n'a ressenti le moindre trouble. Quatre autres personnes, qui ont avalé jusqu'à 1/4 de culture fraîche du vibrion de Genève sur gélose, n'ont pas eu non plus le moindre dérangement dans leurs fonctions intestinales ou autres.

Mais peut-être que parmi ces vibrions si inoffensifs, il s'en trouve quelques-uns capables de vacciner l'homme contre le microbe du choléra?

Comme ce ne sont pas les localités, mais bien leurs habitants qui sont indemnes contre le vibrion cholérique, s'il intervient une influence vaccinante quelconque dans cette immunité, elle pourrait peut-être se traduire par une augmentation du pouvoir préventif du sang des habitants contre la péritonite cholérique des cobayes. Des recherches antérieures dans cette direction n'étaient pas, à vrai dire, très encourageantes, puisqu'elles ont démontré le peu de concordance entre cette propriété préventive et l'immunité (voir notre premier mémoire). Mais, étant donnée la difficulté du problème, on devait tout de même essayer de l'aborder par ce côté. Après avoir absorbé un demi-litre de cultures cholériques stérilisées, M. Klemperer[1] a vu la propriété préventive de son sang s'accroître de 25 fois. Pourquoi l'absorption journalière de vaccins vivants ne produirait-elle pas quelque chose d'analogue, chez les habitants des localités indemnes?

Grâce au concours de plusieurs collègues, et notamment de M. Lyonnet, auxquels j'adresse ici mes remerciements, j'ai pu me

1. *Berl. klin. Wochenschr.*, 1892, p. N. 50.

procurer du sang de plusieurs personnes, habitant Versailles et Lyon, ces deux endroits classiques pour leur immunité contre le choléra. Le sang de quatre Versaillais, entrés à l'hôpital civil de Versailles, s'est montré très peu préventif, même à des doses élevées. Dans un cas seulement, 1 c. c. de sérum sanguin a préservé un cobaye de 420 grammes contre un tiers d'une culture de choléra de Courbevoie (dose mortelle), injectée dans le péritoine. Le sérum des trois autres Versaillais, injecté à la dose de 1,5 c. c. dans le péritoine, 21 heures avant l'épreuve avec 1/3 de culture du vibrion de Courbevoie, n'a pas sauvé des cobayes de 370 à 420 grammes.

Le sang des Lyonnais s'est montré plus efficace que celui des Versaillais. Sur dix personnes étudiées sous ce rapport, deux ont présenté le pouvoir préventif à la dose de 0,5 c. c. de sérum ; dans d'autres cas, la dose préservative était de 0,8 à 1 c. c. et au delà. Un vieillard de 68 ans, né à Lyon qui a toujours habité cette ville et qui boit régulièrement l'eau du Rhône, a un sang dont le sérum, injecté à la dose de 1 c. c., 1,5 c. c. et 4 c. c. dans le péritoine de trois cobayes de 393 à 422 grammes, ne les a pas empêchés de mourir de péritonite cholérique. Le cobaye qui a reçu la dose maxima de sérum (4 c. c.) est mort en 9 h. 1/2, même avant le témoin. Un autre Lyonnais, âgé de 31 ans, qui est aussi né à Lyon et habite constamment cette ville, a fourni un sérum sanguin, dont des doses de 0,5 c. c. et 0,25 c. c. n'ont pas préservé les cobayes, tandis que les doses de 1 c. c., 1,5 c. c. et 2 c. c. ont été efficaces.

Je n'ai pas cru nécessaire de poursuivre plus loin ces recherches, parce que *les faits établis dans ces 14 cas n'ont nullement permis d'admettre l'existence d'une propriété préventive particulière au sang des habitants des localités indemnes contre le choléra.* Si les expériences avaient démontré le contraire, c'est-à-dire un pouvoir préventif extraordinaire du sang des habitants d'une localité, on aurait pu en conclure à un état de vaccination naturelle. Mais d'un autre côté, le fait que cette propriété s'est montrée là semblable à ce qu'elle est ailleurs ne permettait pas encore de nier la possibilité d'un *état vacciné* des habitants des localités indemnes.

III

TENTATIVES DE VACCINATION INTESTINALE.

Pour résoudre le problème abordé dans le précédent chapitre, il a fallu de nouveau recourir au moyen suprême, mais le seul efficace : l'essai sur l'homme. Plusieurs des personnes qui s'étaient assurées de l'innocuité relative de l'ingestion des vibrions des eaux, s'étaient bénévolement soumises à de nouvelles épreuves. Je leur adresse ici mes remercîments.

Je dois rappeler que quelques-unes des expériences de mon deuxième mémoire indiquaient la possibilité de la vaccination de l'homme par voie intestinale. J'ai dit que M. Latapie et moi-même nous n'avons éprouvé aucun effet à la suite de l'absorption de cultures fraîches du vibrion de Hambourg, faite après deux ingestions préalables des mêmes vibrions plus ou moins âgés. Je faisais suivre l'exposé de ces faits de la réflexion suivante :

« Quoiqu'il soit difficile de tirer des conclusions certaines d'un petit nombre de faits, il paraît cependant résulter de cette expérience sur le vibrion de Hambourg que l'ingestion préalable des cultures âgées de plusieurs jours n'occasionne non seulement aucun trouble intestinal (ou autre), mais vaccine contre l'action diarrhéique des cultures jeunes du même microbe. » (*Ann.*, 1893, p. 577.) Certains autres faits, recueillis par MM. Klemperer, Hasterlik, Sawtchenko et Zabolotny, semblaient corroborer cette conclusion. D'un autre côté, cette idée que, pendant les épidémies cholériques, la moindre attaque cholériforme, ou même une action inaperçue du virus spécifique, pouvaient protéger contre le vrai choléra, était tellement plausible et répandue qu'on devait s'attendre *a priori* à sa confirmation entière. M. Ferran [1] admettait que « la disparition spontanée du choléra est due à ce que la masse de la population contaminable se trouve vaccinée », en conséquence de quoi il a proposé de vacciner les hommes en infectant « les eaux potables avec de grandes quantités de cultures atténuées de bacille-virgule ».

Examinons d'abord les faits qui se rapportent à cette question. J'ai fait en tout (sans parler de l'expérience citée plus

1. *Comptes rendus de la Soc. Biol.*, 1892, nº 30.

haut), sept expériences, dont deux ont été exécutées dans des conditions identiques. Après avoir absorbé, sans aucun effet, deux gouttes d'une émulsion en bouillon de vibrions de Saint-Cloud déjà âgés [1], deux personnes, MM. M... et J..., ont bu onze jours plus tard, trois gouttes d'une émulsion des vibrions de la même race, mais plus jeunes [2]. Cette fois encore l'effet fut absolument nul. Et cependant une troisième personne, qui absorba trois gouttes d'une culture même plus ancienne du vibrion de Saint-Cloud, fut prise d'une diarrhée qui dura plusieurs jours. Ceci indiquait donc une influence vaccinale de la première dose ingérée. Une semaine après la seconde dose, MM. M... et J... absorbèrent (toujours immédiatement après avoir ingéré 1 gr. de bicarbonate de soude dans de l'eau) deux gouttes d'une émulsion du vibrion de Versailles (Seine), âgée de 11 jours [3]. Une goutte de la même culture occasionna une diarrhée légère, mais très liquide, quoique colorée, chez une troisième personne, qui absorbait les vibrions pour la première fois. Comme MM. M... et J... n'éprouvèrent aucun trouble, on devait certainement conclure à un effet vaccinal des plus manifestes. Dans cette expérience, exécutée en deux séries, les personnes vaccinées restaient indemnes, tandis que les témoins non vaccinés eurent la diarrhée.

Un troisième cas se prêtait à une conclusion analogue. Une personne, M. B..., après avoir bu 1/12 d'une culture sur gélose du vibrion de Versailles (Seine) [4], a eu pendant trois jours une diarrhée liquide, mais colorée. L'état général était parfait. La diarrhée était cependant spécifique, et le vibrion cholérique de

1. Le vibrion de Saint-Cloud avait été semé 40 jours auparavant sur gélose et maintenu pendant 3 jours à 35°; ensuite la culture avait été transportée au laboratoire, dont la température variait entre 15 et 17°. Huit jours avant son emploi, la culture était mélangée avec du bouillon. Deux gouttes correspondaient à 1/25 de la culture totale. Les vibrions ont été versés dans de l'eau pure et bus immédiatement après l'absorption d'une solution de 1 gr. de bicarbonate de soude par personne).

2. Une culture du vibrion de Saint-Cloud était faite sur gélose 14 jours avant son usage. Maintenue pendant à 36°, elle était mélangée avec du bouillon et conservée au laboratoire dans un tube fermé. La prise des vibrions était également précédée de celle de 1 gr. de bicarbonate de soude.

3. Cette culture s'était développée pendant 20 heures à 36° dans l'eau peptonisée avec 2 0/0 de gélatine, et conservée à la température de la chambre pendant 10 jours.

4. La culture était développée pendant 21 heures à 36° et conservée pendant 5 jours au laboratoire à 15-17°. Immédiatement avant les vibrions, M. B. absorbait chaque fois 1 gr. de bicarb. de soude dans de l'eau.

Versailles en pouvait être isolé avec la plus grande facilité. Douze jours après la première ingestion, M. B. but 1/12 d'une culture[1]. Cette fois il n'éprouva aucun trouble et n'eut pas la moindre diarrhée.

Poursuivons l'exposé de nos essais de vaccination.

Un vieillard de 69 ans, M. C..., prit à jeun, après avoir neutralisé l'acidité gastrique avec une solution de 1 gramme de bicarbonate de soude, 2 gouttes d'une émulsion du vibrion de Saint-Cloud, décrite dans la note 1 de la page précédente. L'effet fut nul sous tous les rapports. Une semaine après la première expérience, M. C... a absorbé (immédiatement après la prise d'un gramme de bicarbonate) quatre gouttes de la même culture, plus âgée de 7 jours. Malgré que celle-ci datât déjà de 40 jours et que M. C... eût subi une ingestion vaccinale, la diarrhée spécifique se déclara le lendemain, et dura toute une semaine. Elle était légère et n'a été compliquée par aucun trouble, mais sous ce rapport elle ne se distinguait en rien des autres cas où la diarrhée s'était développée sans tentatives préalables de vaccination. Les selles colorées donnaient le vibrion de Saint-Cloud à côté du *B. coli*.

Dans une autre expérience, M. P... absorba (après avoir bu une solution d'un gramme de bicarbonate) 2 gouttes de l'émulsion du vibrion de Saint-Cloud qu'avait bue M. C... Il ne s'ensuivit aucun effet. Cinq jours plus tard il avala 1 gramme de bicarbonate et 3 gouttes de la même émulsion. Le lendemain se déclara la diarrhée. Elle était légère, dura 6 jours et ne présenta aucune complication. Les selles étaient liquides, mais colorées, et donnaient des colonies caractéristiques sur des plaques de gélatine.

Dans deux autres expériences je combinai le vibrion de Saint-Cloud, moins pathogène pour l'homme, avec le vibrion de Versailles (Seine), plus actif. Je voulais éprouver l'effet vaccinal du premier contre le second. Dans ce but M. C... but deux gouttes d'une émulsion en bouillon du vibrion de Saint-Cloud sur gélose, développée pendant 24 heures à 36°, et conservée pendant 9 jours

1. Le vibrion de Versailles (Seine) avait été semé sur gélose deux jours avant son absorption. Cultivé pendant 22 h. 30 min. à 36°, la culture était portée au laboratoire et, la veille de l'expérience, diluée avec du bouillon et aspirée dans un tube.

au laboratoire. Cette fois l'absorption n'était pas précédée de celle du bicarbonate. M. C... ne ressentit aucun trouble, et se soumit à une seconde expérience une semaine après le début de la première. Il but d'abord une solution d'un gramme de bicarbonate, et aussitôt après une goutte d'une culture de Versailles (Seine) dans l'eau peptonisée avec 2 0/0 de gélatine. La même quantité de la même culture, et prise dans les mêmes conditions, a été le même jour avalée par M. L..., dans une expérience décrite page 533 de ce mémoire. Tandis que chez ce dernier il se développa le lendemain une diarrhée légère et colorée, M. C... ne ressentit d'abord aucun effet. Cinq jours après l'absorption des vibrions de Versailles, M. C... éprouva une lassitude générale, et le jour suivant se déclara chez lui une diarrhée abondante. Les selles devinrent incolores et riziformes, et renfermaient beaucoup de vibrions minces de Versailles qui poussaient abondamment dans les cultures. La température baissa jusqu'à 36°,5 dans le rectum. Cette diarrhée dura 3 jours, mais elle n'était accompagnée ni de vomissements, ni de crampes. L'état général s'améliora aussitôt et la température redevint normale.

Voilà donc un cas où une dose très petite de vibrions provoqua chez une personne, soumise d'abord à un traitement préventif, une diarrhée cholériforme, beaucoup plus violente que chez la personne qui servait de témoin. On voudrait peut-être attribuer l'inefficacité vaccinale de la première dose à ce fait qu'elle avait été prise sans alcalinisation préalable de l'acidité gastrique. Voici une expérience capable d'élucider cette supposition.

M. G... a bu, après l'absorption d'une solution d'un gramme de bicarbonate, 3 gouttes de l'émulsion du vibrion de Saint-Cloud, décrite dans la note 1 de la page 542 et mentionnée page 543 de ce mémoire. Une semaine plus tard il prit une goutte d'une émulsion du même vibrion, cultivée pendant 4 jours sur gélose à 36°. Cette fois, comme dans les deux qui vont suivre, M. G... absorba préalablement 1 gramme de bicarbonate de soude. Neuf jours après la seconde dose, M. G... en avala une troisième, composée de 3 gouttes d'une culture dans l'eau peptonisée additionnée de 2 0/0 de gélatine, décrite dans la note 3 de la page 542. Ces trois ingestions ne furent suivies d'aucun effet. Lorsque, juste une semaine après la troisième

dose, M. G... but 2 gouttes de la même suspension du vibrion de Versailles (Seine) qui a été si bien supportée par MM. M... et J... (page 543 et note 1), il se déclara chez lui une diarrhée. Commencée 36 heures après la dernière absorption des vibrions, cette diarrhée a duré 4 jours, sans s'être compliquée de trouble général. Les déjections étaient en rapport avec la maladie, de consistance aqueuse et de couleur gris clair. Elles renfermaient, à côté de toutes sortes de bactéries, des vibrions minces en grand nombre. Il a été facile d'isoler de ces selles des cultures pures du vibrion de Versailles (Seine). Voici donc un exemple où trois doses préalables, toujours précédées de bicarbonate, n'ont exercé aucune action vaccinante.

L'ensemble des faits exposés dans ce chapitre nous ôte donc tout droit d'accepter la vaccination naturelle par voie intestinale comme quelque chose de constant ou tant soit peu général. Le résultat de l'examen de la propriété préventive du sang des Lyonnais et des Versaillais se trouve ainsi pleinement corroboré.

Comme nos expériences démontrent que même *des vibrions cholériques, absorbés dans des conditions particulièrement favorables pour leur activité vaccinale, ne protègent pas l'organisme contre l'effet pathogène de ces microbes*, il a été inutile d'étendre les recherches au cas où l'organisme n'était préalablement soumis qu'à l'action des vibrions inoffensifs, comme ceux de Lyon (Rhône), de Genève ou de Versailles (autres que celui isolé de l'eau de la Seine). Et ceci d'autant plus que dans une expérience, relatée dans mon deuxième mémoire (*l. c.*, p. 576), le vibrion de Gamaleïa, administré à forte dose, s'est montré incapable d'empêcher l'action diarrhéique du vibrion de choléra de Hambourg.

IV

INFLUENCE DES MICROBES SUR LES VIBRIONS EN CULTURE.

A la suite des faits rapportés dans les deux chapitres précédents, l'hypothèse d'un état de vaccination inconsciente et permanente des personnes indemnes contre le choléra devait être définitivement écartée, ce qui permettait d'aborder le programme de recherches tracé à la fin de mon deuxième mémoire.

D'un autre côté, les observations sur l'effet des vibrions des

eaux chez l'homme renforçaient les déductions qui découlaient de mes expériences publiées en 1893. On voyait bien qu'à l'action de ces microbes s'ajoutait quelque facteur tout à fait particulier, qui imprimait un caractère bizarre à leur rôle dans les troubles intestinaux. La prédisposition individuelle entre en jeu dans toutes les infections, mais jamais on ne voit cet élément prédominer à ce point dans aucune maladie expérimentale. Dans mes recherches, relatées dans mon deuxième mémoire, le choléra était provoqué par un vibrion des moins virulents, conservé au laboratoire pendant neuf années, tandis que des bacilles-virgules d'origine récente n'occasionnaient que des diarrhées insignifiantes. Dans les expériences sur les vibrions des eaux, l'indigestion la plus cholériforme a été produite par une faible dose du vibrion de Versailles, vieille de 11 jours. L'effet de ces vibrions est tellement irrégulier, que toutes nos connaissances sur la virulence, vaccination, etc., dans les maladies infectieuses, ne permettent nullement de prévoir les phénomènes. Il est évident que le microbe cholérique subit, dans les organes digestifs, quelque influence qui rend son effet inconstant et imprévu.

Dans un travail récent, M. G. Klemperer[1] a abordé cette question. Il insiste avec raison sur l'impossibilité d'expliquer l'inefficacité si fréquente du vibrion cholérique chez l'homme par l'action désinfectante du suc gastrique. Et ceci à la suite du fait qu'on trouve souvent ces microbes dans des selles de personnes bien portantes ou ne présentant qu'une diarrhée légère. Les vibrions ont donc pu traverser l'estomac, et se multiplier dans l'intestin ; mais ici ils se sont heurtés à quelque obstacle gênant leur action pathogène. D'après M. Klemperer, c'est la nucléine de l'épithélium intestinal qui exercerait cette action empêchante contre le vibrion de Koch. Il admet « que la cause essentielle de l'immunité naturelle de l'homme et des animaux contre le choléra asiatique, est que le poison des bacilles-virgules végétant dans le canal intestinal est transformé pendant sa résorption en substance immunisante, grâce à l'action de la nucléine de l'épithélium. » Lorsque les cellules de l'épithélium ont été nécrosées, la nucléine, n'agissant que dans un milieu acide ou

1. *Deutsche med. Wochenschr.*, 1894, p. 435.

neutre, ne remplit plus son rôle protecteur, à la suite de quoi le vibrion cholérique empoisonne l'organisme. Je ne me propose nullement de discuter ici cette hypothèse qui ne se prête pas encore, dans l'état actuel de la science, à une étude expérimentale rigoureuse. Je me contenterai seulement de dire que les faits, sur lequels s'appuie M. Klemperer, ne prouvent pas du tout la destruction des toxines par la nucléine de la paroi intestinale. Ce qui frappe surtout dans les considérations de ce savant, c'est qu'il ignore complètement le rôle des microbes du canal digestif. Or, il est extrêmement probable que ces organismes doivent exercer une influence sur le vibrion cholérique, comme je l'avais déjà supposé dans mon deuxième mémoire. Lorsqu'on réfléchit à l'immunité de l'homme contre le choléra, et à l'influence du temps et des lieux, deux facteurs mis en relief par les travaux épidémiologiques de M. Pettenkofer sur la marche des épidémies cholériques, on est amené à se demander si l'intervention des microbes des organes digestifs ne présenterait pas ici une grande importance. Dans tous les cas, il est plus facile d'expliquer le caractère endémique du choléra dans certaines localités, et l'immunité temporaire ou permanente de certaines autres, par l'influence de la flore microbienne, qui peut revêtir également un caractère local et temporaire, que par le changement dans les propriétés essentielles des tissus, telles que la composition chimique des noyaux de l'épithélium.

Guidé par des considérations de cette nature, je me suis posé la question de l'influence des microbes sur le vibrion du choléra. Ce problème a déjà fait le sujet d'études circonstanciées de M. Kitasato en 1889 [1]. Voici le résultat général auquel est arrivé ce savant : on n'a pu retrouver aucune espèce bactérienne capable de détruire les bactéries cholériques sur des milieux nutritifs artificiels, à l'aide de leur croissance simultanée et concurrente. Il a été au contraire établi que toute une série de microbes différents sont empêchés dans leur développement et même tués en peu de jours par le vibrion cholérique. Comme exemple de ce genre d'action, je dois signaler ce phénomène que les bacilles charbonneux qui entrent en contact avec les bactéries cholériques dans les cultures, périssent sous leur influence en

1. *Zeitschr. f. Hyg.* 1889, *F. VI*, p. 1.

un temps relativement court. Et cependant M. Kitasato lui-même a fait des observations qui ne s'accordent pas complètement avec ce résumé général. Ainsi il a observé que « le bacille pyocyanique est plus fort que les bactéries cholériques ». J'ai pu à maintes reprises confirmer ce fait dans des cultures sur différents milieux.

Dans mes recherches, j'ai suivi un procédé différent de celui de M. Kitasato. Tandis que cet observateur employait des vibrions des plus vigoureux, qu'il cultivait en majeure partie sur les milieux les plus appropriés pour ce microbe, je me servais, comme point de départ, d'un vibrion qui ne se développe que faiblement ou pas du tout sur la plupart des milieux. J'ai commencé mes études sur ce sujet avec le vibrion des déjections normales, brièvement mentionné à la page 565 de mon deuxième mémoire.

Examinant d'une façon suivie la flore des déjections normales, j'ai constaté que dans les selles liquides, conservées pendant un temps plus ou moins long dans des bocaux stérilisés, se développaient des vibrions abondants. Pour la plupart c'étaient des bactéries ne liquéfiant que fort peu ou pas du tout la gélatine. Mais, dans un cas où il s'agissait des déjections liquides d'une personne bien portante, provoquées par un purgatif, j'ai trouvé sur plaque de gélatine des colonies en entonnoir, tout à fait semblables à celles du vibrion cholérique. La découverte fut faite quatre mois après l'émission des selles, ce qui pouvait expliquer certaines particularités du vibrion. De forme tout à fait typique, identique à celle du bacille-virgule original de Koch, le vibrion en question ne poussait qu'à des températures inférieures à 30°, ne donnait pas la réaction indol-nitreuse, et, cela va sans dire, n'était pas pathogène pour les animaux. Abandonné pendant les vacances, ce vibrion s'est affaibli encore plus, de sorte qu'il ne se développait que dans l'eau peptonisée. Il s'agissait de le remonter et de le faire pousser de nouveau sur des plaques de gélatine. C'est alors que se présenta une occasion favorable pour étudier le rôle des différents microbes.

Je semai une grande quantité de vibrions sur des plaques de gélatine nutritive à 10 0/0. Le lendemain je constatai l'absence de toute culture. Alors j'exposai des plaques à l'air libre, ou bien je semai sur leur surface de petites quantités

d'autres microbes. J'ai pu facilement constater que mon vibrion subissait une grande influence de la part de ces organismes ajoutés. Tandis que certains d'entre eux faisaient pousser des colonies vibrionniennes, d'autres n'exerçaient cette action que d'une façon très incomplète, ou bien n'agissaient pas du tout. Dans le cas d'action favorisante, les colonies du vibrion se développaient dans le voisinage immédiat du microbe adjuvant, l'entourant comme d'une rangée de satellites. On voyait bien qu'au fur et à mesure que les colonies s'éloignaient du microbe favorisant, elles devenaient de plus en plus petites (fig. 1).

Cette série de recherches a permis d'établir un certain nombre de faits sur l'action favorisante ou gênante des microbes sur le vibrion en question. J'ai pu constater que des microbes très variés permettent un développement abondant des vibrions sur des plaques sur lesquelles, sans leur concours, il n'y a pas du tout de culture. L'hypothèse que c'est en liquéfiant la gélatine que les microbes favorisaient le vibrion ne poussant que dans des milieux liquides, devait être écartée par ce fait, que cette action favorable était souvent exercée par des microbes qui ne liquéfiaient pas du tout la gélatine. Une autre supposition, que l'influence favorisante consistait en une sécrétion alcaline des microbes, a pu être aussi facilement écartée à l'aide de plaques de gélatine à laquelle j'avais ajouté une solution de tournesol. Parmi les microbes favorisants se trouvaient même quelques-uns qui produisaient une réaction acide.

Il serait inutile d'énumérer ici tous les microbes étudiés sous ce rapport. Je me contenterai de signaler parmi les microbes favorisants plusieurs bacilles, donnant des cultures colorées ou incolores, et surtout des sarcines et des formes-levures, désignées souvent sous le nom de *Torula*. Lorsque je veux revivifier un vibrion qui refuse de pousser, je le sème avec la torula blanche (*weisse Hefe* des auteurs allemands). L'avantage est que les torulas qui exercent l'influence la plus favorable sur les vibrions, ne liquéfient pas la gélatine, et permettent ainsi plus facilement d'isoler les colonies satellites.

Tandis qu'un grand nombre de microbes favorisent si nettement le développement des vibrions, d'autres exercent une influence contraire. Non seulement ils ne se présentent jamais entourés par des colonies vibrionniennes, mais ils gênent même

leur développement autour des microbes favorisants. Cette influence peut être bien étudiée sur des plaques de gélatine dans lesquelles on a introduit des vibrions, et sur la surface desquelles on a semé par stries en forme de croix un microbe favorisant et un autre empêchant. On observe alors que les colonies vibrionniennes se développent abondamment autour du microbe favorisant et loin du microbe empêchant. Plus on s'approche du point d'intersection des deux stries, plus l'influence du microbe empêchant devient manifeste. Autour de ce dernier, il ne se produit aucun développement de colonies vibrionniennes.

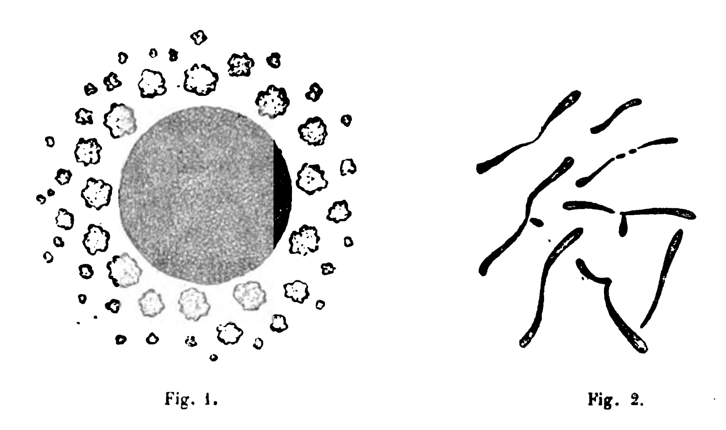


Fig. 1. Fig. 2.

Parmi les microbes empêchants, il faut citer certains bacilles liquéfiant très fortement la gélatine, et par conséquent peu commodes pour l'étude au moyen des plaques. Dans cette catégorie rentre le bacille pyocyanique, dont l'action nuisible vis-à-vis du vibrion cholérique a déjà été signalée par M. Kitasato. Comme espèce plus commode pour l'examen de la propriété empêchante, je dois citer un coccus, isolé de l'air et donnant des cultures blanches sur des milieux solides. Pendant les premiers jours il empêche complètement le développement du vibrion, mais au bout d'un temps plus long il commence à céder. Le vibrion pousse alors au voisinage du « coccus blanc », mais il ne donne que des colonies rares et pauvres en individus. Ce qui est plus remarquable encore, c'est que, dans ces conditions, le vibrion revêt un aspect tout particulier. Au lieu de se présenter comme un petit vibrion, il se développe sous forme de

doubles massues très grandes, et absolument semblables à ces formes d'involution, qu'on connaît surtout chez le bacille de la tuberculose aviaire (fig. 2). Cette ressemblance s'accentue encore, lorsque le vibrion commence à produire des bourgeons latéraux, dont le nombre est cependant plus petit que chez le bacille de la tuberculose. La constance de cette modification indique une influence particulière du coccus blanc sur les fonctions du vibrion. Il se produit ici quelque chose d'analogue au fait constaté par M. Schimmelbusch, d'une influence microbienne empêchant la production de la matière colorante par le bacille pyocyanique.

Pour s'assurer jusqu'à quel point la forme des vibrions est

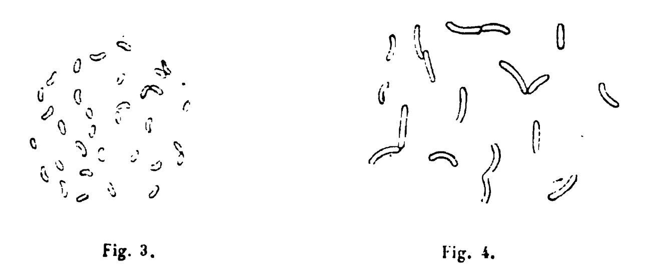


Fig. 3. Fig. 4.

influencée par le voisinage des microbes, il n'y a qu'à comparer l'aspect bizarre des vibrions qui végètent à côté du coccus blanc (fig. 2), avec les mêmes vibrions, développés sous l'action favorisante d'autres microbes. Au voisinage d'une sarcine jaune, isolée de l'air, ce vibrion se présente sous forme d'une petite « virgule » recourbée, quelquefois presque ovale (fig. 3). Sous l'influence plus favorisante de la torula blanche, il devient beaucoup plus long et revêt dans ces conditions la forme typique (fig. 4).

Après avoir constaté les faits que je viens de signaler, j'ai dû m'assurer si les mêmes règles s'appliquent à des vibrions beaucoup plus vigoureux que le vibrion chétif, isolé des déjections normales. Dans ce but j'ai choisi le vibrion de Massaouah, comme le plus fort. Ensemencé sur des plaques préparées avec une gélatine ancienne, ou avec une gélatine acide, le vibrion de Massaouah s'est comporté d'une façon tout à fait analogue. Dans ces conditions il a subi la même influence des mêmes microbes favorisants ou empêchants.

Comme on devait supposer que ces faits pourraient avoir une importance dans la question du choléra, j'ai voulu établir si les microbes qui habitent les organes digestifs de l'homme et des animaux se distinguent par leur influence sur les vibrions cholériques. Pensant que ce ne sont point les microbes qui se trouvent dans les déjections, mais bien ceux qui habitent les régions supérieures de l'appareil digestif, qui doivent jouer un rôle dans le choléra, je me suis mis d'abord à étudier la flore de l'estomac humain. Grâce au concours de M. le Dr Lion, auquel j'adresse ici tous mes remerciements, j'ai pu me procurer un certain nombre d'échantillons du suc gastrique de personnes à jeun ou en digestion du repas d'épreuve de M. Ewald.

J'ai pu isoler plusieurs microbes de l'estomac, qui exerçaient une influence favorisante sur les vibrions. Le premier rang est occupé par une torula que j'ai trouvée dans l'estomac d'une personne, atteinte d'hypopepsie (ou anachlorhydrie). Une sarcine isolée de l'estomac d'une autre personne, a manifesté aussi une influence favorable sur les vibrions. Parmi les bacilles de l'estomac, il s'est trouvé une espèce ne liquéfiant pas la gélatine, et donnant de l'acide lactique avec du sucre de lait, qui se distingue aussi par son action favorisante sur les vibrions. Des microbes, agissant en sens inverse, ont été isolés des intestins des animaux, notamment des cobayes. Plusieurs espèces de bacille et un gros coccus sont surtout remarquables sous ce rapport.

Les vibrions cholériques sont donc des êtres très sensibles à l'influence des microbes qui les entourent : leur croissance et même leurs formes extérieures subissent l'action des organismes avec lesquels ils se trouvent en relations de voisinage.

V

IMMUNITÉ DES ANIMAUX CONTRE LE CHOLÉRA.

Il était tout naturel, après avoir établi les faits qui précèdent, de chercher à les appliquer à l'étude de l'immunité des animaux contre le choléra intestinal.

Je n'ai pas besoin, — le fait étant suffisamment connu, — de

rappeler au lecteur les tentatives innombrables pour donner le choléra intestinal à des animaux de différentes espèces. Pour arriver à ce but, il a fallu recourir à des procédés spéciaux, comme la ligature du canal cholédoque (Nicati et Rietsch), ou l'injection de la teinture d'opium (Koch), ou de l'alcool (Doyen). Ces dernières méthodes étaient encore combinées avec l'administration préalable de l'alcali dans l'estomac, dans le but de neutraliser l'acidité du suc gastrique.

Tout récemment encore, M. Klemperer [1] a injecté des quantités de vibrions cholériques directement dans l'intestin des lapins. Les vibrions restèrent vivants pendant un certain temps, mais les lapins n'éprouvaient aucun mal.

Parmi toutes les espèces étudiées (M. Koch s'est servi aux Indes d'un grand nombre de différents mammifères), seul le spermophile (*Spermophilus guttatus*) de la Russie méridionale s'est montré, d'après la découverte intéressante de M. Zabolotny [2], sensible à l'injection du vibrion cholérique. Ce rongeur, qui prend l'infection mortelle avec des petites doses de vibrions, injectés dans la cavité péritonéale, meurt du choléra intestinal lorsqu'on lui donne à boire quelques gouttes de cultures vibrionniennes. Dans ces conditions, la moitié des spermophiles meurt, l'autre résiste. Lorsque M. Zabolotny ajoutait de la soude à la nourriture contaminée avec les vibrions, la mortalité des spermophiles devenait plus grande ; un certain nombre d'animaux résistait cependant. La maladie se manifestait par de la faiblesse, absence d'appétit, hypothermie prononcée, et souvent par la diarrhée. Plusieurs fois M. Zabolotny a observé des crampes cloniques des extrémités et la cyanose du nez et de la langue. A l'autopsie, le canal digestif a été trouvé hyperémié, distendu, et renfermant un contenu liquide, riche en vibrions. Ces microbes pénètrent souvent dans les organes abdominaux, le péritoine, et assez fréquemment envahissent le sang.

Le même rongeur s'est montré, d'après les expériences de M. Palmirsky [3], encore plus sensible vis-à-vis du vibrion de

1. *Deut. med. Woch*, 1894, p. 435.
2. *Centralb. für Bakteriologie*, 1894, p. 150.
3. *Archives des sciences biologiques*. Saint-Pétersbourg, 1893, p. 497.

Gamaleïa (*V. Metchnikowii*). La nourriture, à laquelle on avait ajouté des cultures de ce microbe, transmettait la maladie intestinale. M. Palmirsky a même observé plusieurs cas de contamination de spermophiles, qui avaient mangé des cadavres de leurs congénères morts de la maladie vibrionniene. A la suite de ces recherches, il propose le vibrion de Gamaleïa comme moyen pratique de destruction du spermophile, rongeur très nuisible à l'agriculture.

Comme le spermophile est un animal qui ne se reproduit jamais en captivité, et ne se trouve en quantité suffisante que pendant une certaine saison de l'année, et dans un nombre restreint de localités, il a fallu chercher un moyen pour obtenir le choléra intestinal dans des conditions plus accessibles. Il n'est pas besoin de fatiguer le lecteur par l'énumération de toutes mes tentatives infructueuses. Dès mes premières recherches dans cette direction, j'ai dû abandonner l'emploi de la sonde stomacale. Il est facile d'éviter les lésions grossières avec cet instrument, mais, lorsqu'il s'agit de vibrions très virulents, des érosions, par elles-mêmes insignifiantes, peuvent amener l'infection mortelle. La sonde a pu être définitivement supprimée, parce que le suc gastrique est loin d'être aussi funeste au vibrion cholérique qu'on se le figure d'habitude. Déjà MM. Straus et Wurtz [1] ont démontré que ce microbe résiste pendant 2 heures à l'action du suc gastrique.

Dans mes expériences sur le cobaye, j'ai pu m'assurer à maintes reprises que les vibrions avalés avec la nourriture (luzerne et carottes), ou donnés tels quels, passent à travers l'estomac normal. Il se produit sûrement une destruction d'un certain nombre de ces microbes sous l'influence de l'acide, mais elle est insuffisante pour l'empêcher de pénétrer dans l'intestin. Lorsqu'on sacrifie des cobayes âgés de plusieurs jours, et auxquels on a donné à ingérer des vibrions cholériques, ceux-ci peuvent être facilement retrouvés (à l'aide de cultures) dans plusieurs parties du trajet intestinal, jusqu'à 5 jours et quelquefois même plus longtemps après l'absorption des vibrions. Il arrive que des cobayes, nourris avec ces microbes, meurent au bout de quelque temps. La constatation des vibrions dans les

1. *Archives de médecine expérimentale*, 1889, p. 382.

intestins pourrait suggérer l'idée d'une infection cholérique : on se tromperait. Il s'agit ici d'une mort occasionnée par une autre cause quelconque, ce qui n'empêche nullement les vibrions de persister dans le canal intestinal. De cette façon, il a pu être démontré que, malgré le passage du virus cholérique à travers l'estomac acide et sa conservation dans l'intestin, les cobayes, même jeunes, résistent à l'infection. Le résultat était le même, lorsque j'ai remplacé le vibrion cholérique par le vibrion de Gamaleïa, plus virulent encore pour le cobaye. Très sensibles à l'inoculation sous-cutanée de ce microbe, les cobayes supportaient sans aucun trouble l'ingestion de fortes doses de cultures sur gélose du même vibrion.

M. Karlinsky, lors de son séjour à Paris au printemps de l'année courante, a été témoin de plusieurs de mes tentatives infructueuses pour provoquer le choléra intestinal chez les animaux. Il me conseilla alors de m'adresser à des jeunes chats. Ce conseil fut suivi aussitôt. Quatre chats, se nourrissant de lait, ont avalé des quantités considérables de culture du vibrion de Massaouah des plus virulents. Un petit chat de dix jours en a reçu deux grandes cultures entières sur gélose sans éprouver le moindre inconvénient. Deux autres chats, âgés de 12 et de 17 jours, ont avalé la même quantité de vibrions, mais avec le même résultat négatif. Un chat âgé de 1 mois reçut dans son estomac, après alcalinisation préalable de l'acidité gastrique avec du carbonate de soude, une culture entière du vibrion de Massaouah. L'effet fut encore nul.

Deux petits chiens ont avalé, le lendemain de leur naissance, une culture de Massaouah sur gélose, développée à 36° pendant 24 heures. Le jour suivant ils avalèrent encore chacun la même dose. Les vibrions n'ont pas occasionné le moindre trouble dans la santé de ces petits chiens, dont l'un a été sacrifié deux semaines après le début de l'expérience. Des cultures de son contenu intestinal dans de l'eau peptonisée ont démontré que le rectum renfermait encore des vibrions de Massaouah. Le passage à travers l'estomac et la conservation du microbe cholérique dans l'intestin n'ont pas empêché les petits chiens de rester parfaitement indemnes.

Non seulement les petits carnassiers, mais aussi certains rongeurs se sont montrés réfractaires au choléra intestinal dès leur

âge le plus tendre. Des petites souris de huit jours ont avalé des quantités considérables de vibrions de Massaouah, cultivés sur gélose, sans le moindre inconvénient. Des petites gerbilles, âgées de cinq jours, ont absorbé 1/7 d'une culture sur gélose du vibrion de Massaouah, ce qui ne les a pas empêché de rester bien portantes et de se développer de façon normale.

Comme exemples d'immunité, je puis citer encore des lapins, âgés de plusieurs semaines, tétant encore, mais déjà capables de prendre de la nourriture végétale. Un lapin de 370 grammes avala une culture entière de Massaouah, préparée avec du sang d'un lapin mort de la péritonite produite par le même vibrion. La culture était faite sur gélose dans un grand tube de verre, et s'était développée pendant 24 heures à 36°. Le lapin n'en éprouva pas le moindre trouble. Deux autres jeunes lapins de 243 et 232 grammes, choisis avec intention dans une portée où il y avait eu plusieurs cas de mort par maladie spontanée, ont été nourris avec deux cultures entières de Massaouah sur gélose. Les lapins, faibles dès le début, moururent quatre et cinq jours après l'ingestion des vibrions. L'autopsie ne révéla aucune trace de choléra, et même les cultures ne démontrèrent pas la présence du vibrion absorbé. L'immunité s'est donc conservée malgré l'état maladif grave des lapins.

L'état réfractaire des animaux qui avaient mangé des cultures de vibrions de Massaouah et de Gamaleïa s'est maintenu, même après l'injection de doses mortelles d'une infusion de jequirity dans le péritoine et sous la peau des cobayes. Malgré l'influence de ce poison sur le canal intestinal, les vibrions, qui s'étaient bien maintenus dans cet organe, n'ont cependant pas été capables de produire une affection cholériforme.

Les vibrions, malgré leur pouvoir de pénétrer à travers l'estomac acide et de se conserver pendant un temps plus ou moins long dans les intestins de beaucoup de mammifères, ne provoquent pas le choléra intestinal. L'immunité même des espèces très sensibles à l'introduction péritonéale ou sous-cutanée des vibrions est très grande vis-à-vis du virus, absorbé par la voie digestive.

VI

RÉCEPTIVITÉ DES JEUNES LAPINS POUR LE CHOLÉRA INTESTINAL

Comme il y avait lieu de supposer qu'une large part dans l'immunité des animaux contre le choléra intestinal est due à l'influence des microbes du canal digestif, il était naturel de chercher à supprimer ou au moins à diminuer cette influence. L'idée de stériliser la nourriture et de produire une asepsie intestinale par voie artificielle, n'a donné que des résultats peu encourageants. Il a fallu se contenter d'expérimenter dans les conditions de la nature. Parmi les espèces les plus sensibles au virus cholérique, introduit dans l'organisme par une voie autre que les voies digestives, le cobaye et le lapin occupent le premier rang. Mais le premier, a peine né, commence déjà à prendre de la nourriture végétale et à contaminer son tube digestif par une foule de différents microbes. La flore intestinale des jeunes cobayes est déjà extrêmement riche. Le lapin au contraire ne se nourrit qu'avec le lait de la mère pendant plusieurs semaines. Quoique, dès les premières heures après la naissance, les microbes commencent à se développer dans son canal digestif, la flore intestinale des jeunes lapins reste néanmoins assez pauvre et peu variée. En choisissant ces animaux pour expérimenter sur le choléra, l'intervention des microbes étrangers est réduite à son minimum.

La technique est des plus simples. Avec un instrument non tranchant (je me servais de l'extrémité d'un tube en verre fondu à la lampe et recourbé en arc) on racle la culture développée sur la surface de la gélose, et on l'introduit dans la bouche des jeunes lapins. Ceux-ci en avalent aussitôt la plus grande quantité. Les cultures employées étaient âgées de 24 heures ou à peu près.

Des lapins de 1 à 4 jours seulement, auquels on a donné à avaler les quantités de culture du vibrion de Massaouah, développées sur un et même sur deux tubes de gélose, prennent le choléra intestinal mortel dans la moitié des cas. La maladie se développe lentement, et la mort survient au bout de 6 jours et même plus tard. Il se développe le plus souvent une diarrhée qui amène la mort, ou guérit quelquefois. Les jeunes de la même mère, qui sont en apparence dans les mêmes conditions, présentent à ce sujet de grandes différences. Ainsi, dans une expérience

sur deux petits lapins de quatre jours qui avaient reçu deux cultures de Massaouah, l'un a eu une diarrhée très forte, 5 jours après la première absorption du virus. Le lendemain il a été trouvé mort avec tous les signes du choléra intestinal. Chez le second lapin, la diarrhée se déclara 6 jours après le début de l'expérience. Les déjections renfermaient des quantités considérables de vibrions de Massaouah pendant 8 jours. Après ce laps de temps, la diarrhée changea de caractère, devint colorée, fétide et ne donna plus de vibrions dans les cultures. L'état général du jeune lapin est resté tout le temps très bon, la température était normale, et la guérison était complète vers le vingtième jour après le début de l'expérience. Trois semaines après la disparition de la diarrhée, il mourut brusquement. Mais l'autopsie a démontré que la mort était due à une coccidiose aiguë, et n'avait aucune relation avec l'absorption des vibrions. Dans aucune partie du canal digestif (sans parler d'autres organes) ces microbes ne purent être retrouvés ni à l'aide de cultures, ni sur des préparations.

Ces différences individuelles, qui ont été observées dans d'autres cas, et la transformation de la diarrhée cholérique en diarrhée fétide, faisaient présumer l'intervention d'autres microbes.

Désirant me faire une idée de ce qui se passe dans l'organisme du lapin après qu'il a absorbé une culture entière de Massaouah, j'en ai sacrifié un (âgé de 3 jours) qui, 72 heures après le début de l'expérience, se portait très bien. L'autopsie démontra l'état absolument normal de tous les organes et du canal digestif en particulier. On y trouvait du lait en état de digestion comme chez des lapins qui n'ont été soumis à aucune expérience. L'examen microscopique ne révéla de vibrions ni dans l'estomac, ni dans l'intestin grêle, mais bien dans le cœcum, où ces microbes étaient très nombreux. Il y avait cependant des vibrions vivants dans l'intestin grêle, car les cultures, faites avec le contenu de plusieurs parties de cet organe, étaient composées de vibrions de Massaouah bien typiques.

Les vibrions ingérés passent donc à travers l'estomac (dont la réaction est toujours acide), et s'établissent dans l'intestin grêle et dans le cœcum, où, pour ainsi dire, ils attendent quelque condition favorable pour manifester leur action pathogène.

Après avoir constaté le rôle favorisant de certains microbes

isolés du contenu stomacal de l'homme, sur les cultures des vibrions, il était tout naturel de s'adresser à eux pour faciliter l'action cholérigène.

Le vibrion de Massaouah, ingéré en commun avec la torula et la sarcine de l'estomac humain, a provoqué le choléra mortel chez les quatre lapins, âgés de 4 et de 8 jours, soumis à l'expérience. Mais la mort ne survenait que tardivement, 7 à 9 jours après l'ingestion des microbes.

La combinaison des vibrions avec trois microbes favorisants, isolés de l'estomac de l'homme, a donné de meilleurs résultats, de sorte que, dans la grande majorité de mes expériences, je m'en suis tenu à elle. Je donne d'abord à avaler une culture de la torula, de la sarcine et d'un bacille[1] développés pendant vingt-quatre heures (ou à peu près) sur gélose à 36°. Immédiatement après je fais ingérer une culture du vibrion cholérique, préparée exactement dans les mêmes conditions. Les jeunes lapins résistent rarement à cette épreuve. Sur vingt-deux lapins qui ont reçu la combinaison des quatre microbes, et qui n'ont été soumis à aucune espèce de traitement, deux seulement ont survécu. Souvent la mort survenait déjà dans l'espace de 36 à 48 heures après le début de l'expérience. Dans les cas où la survie était plus longue, j'administrais une seconde dose de microbes favorisants ; plus rarement je donnais encore une et même deux fois des cultures de vibrions. Quelquefois la mort survenait plus tard, en 60-120 heures. Rarement cette période dépassait 200 heures, une fois cependant elle a atteint 288 heures.

Le choléra se présente le plus souvent sous forme d'une diarrhée liquide. Sur 55 lapins, cette forme a été observée 42 fois. Dans les autres 13 lapins, elle a revêtu la forme de choléra sec. Dans ce cas la mort survient brusquement, et la maladie est de courte durée. Lorsque le choléra se manifeste par la diarrhée, la

1. Ces microbes ont déjà été mentionnés dans le chap. IV. La torula est un champignon dont les cultures sur gélose exhalent une odeur aromatique rappelant celle des roses sèches. La sarcine donne des petits groupements et se distingue par des capsules très développées. Ses cultures sont blanches ; en couches épaisses elles prennent une teinte légèrement jaunâtre. Le bacille de l'estomac rentre dans le groupe des coliformes. Ses cultures sur gélose ont un reflet nacré et exhalent une odeur désagréable. Le bacille fait fermenter la lactose en produisant de l'acide lactique droit, d'après le renseignement qui m'a obligeamment été fourni par M. Péré.

maladie est encore quelquefois courte, mais le plus souvent elle se prolonge pendant un temps variable selon les circonstances. La diarrhée est composée d'un liquide incolore, inodore et séreux, qui se répand sur le fond du cristallisoir dans lequel on maintient le lapin, et tache le ventre, la queue et les extrémités des animaux malades lorsqu'ils sont dans leur nid. Au liquide s'associe une mucosité transparente, avec grumeaux de mucus, ronds et colorés en jaune clair. Sur les préparations faites avec le liquide et le mucus, on trouve des quantités de vibrions cholériques, souvent en culture presque pure.

Je n'ai jamais observé de vomissements, et les crampes n'étaient saisissables que peu de temps avant la mort, comme cela ce voit presque dans toutes les maladies mortelles autres que le choléra. L'anurie a été souvent observée, mais dans quelques cas, les lapins, pendant le choléra, urinaient en petite quantité. Dans les cas de guérison, qu'on n'a observés que chez des lapins qui avaient absorbé des vibrions sans les microbes favorisants, il y a eu une polyurie très prononcée, et prolongée pendant plusieurs jours.

Lorsqu'on prend dans la main un lapin cholérique, on est frappé par la mollesse du ventre, due à l'absence de tension des muscles abdominaux. Le lapin malade devient triste et immobile, s'affaiblit visiblement et tient les yeux à demi fermés. La température baisse lentement ou rapidement, selon les cas, jusqu'à 30° et au-dessous. L'hyperthermie est un phénomène que je n'ai observé que dans des cas exceptionnels. J'ai vu une fois la température monter jusqu'à 41°2 (la température normale des jeunes lapins est entre 38° et 39°), ce qui n'a pas empêché le lapin de mourir le lendemain. Par contre je n'ai jamais observé d'élévation de température post-mortelle. Au moment de la mort, la température dans le rectum est voisine de la température ambiante.

La diarrhée cesse souvent avant la mort, et l'agonie est quelquefois très longue. Le museau se refroidit, devient cyanosé, et l'animal reste couché, secoué par des convulsions passagères et des mouvements respiratoires pénibles et lents. On observe dans certains cas une vraie suffocation.

Le tableau anatomo-pathologique est très typique. Le cœur et les poumons sont normaux. Le foie ne présente aucune anomalie

caractéristique. Souvent il est congestionné; d'autres fois, au contraire, anémique. La vésicule biliaire, à de rares exceptions près, renferme une quantité moyenne de bile, couleur vert foncé. La rate est petite, souvent pâle. Les reins ne manifestent aucun changement constant. Pâles à la surface, ils sont souvent congestionnés dans la couche médullaire. La vessie est vide dans la grande majorité des cas. Rarement elle contient un peu d'urine jaune ou jaunâtre, qui ne renferme jamais d'albumine ; la réaction de l'indican fait également défaut.

Il ne se forme jamais d'épanchement péritonéal ou autre, et les organes abdominaux, tels que l'appareil sexuel et la vessie, ne sont jamais hyperémiés.

L'estomac est normal, sauf de très rares exceptions. Il est très distendu par le lait coagulé, entouré d'une couche de mucus transparent. La réaction est presque toujours franchement acide. La paroi n'est jamais congestionnée, mais on distingue quelques arborescences vasculaires.

L'organe atteint dans le choléra intestinal est l'intestin grêle. Il est toujours hyperémié, surtout dans sa partie supérieure, à partir du duodénum. Souvent, cette hyperémie est diffuse et communique à l'intestin la couleur hortensia si caractéristique. Dans les parties inférieures de l'iléum, l'hypérémie devient plus différenciée, et prend une teinte rouge écarlate. Les vaisseaux du mésentère sont également congestionnés. L'intestin grêle est distendu dans toute ou la majeure partie de sa longueur, et renferme un liquide louche, souvent glaireux. Le gros intestin et notamment le cœcum, ne sont presque jamais hyperémiés. Le plus souvent leur paroi est très pâle, mais le cœcum est toujours distendu très fortement, souvent dans des proportions extraordinaires. Cet organe renferme une grande quantité de sérosité très liquide, transparente ou louche, avec des flocons de mucus incolore ou coloré en jaune citron. Souvent l'aspect du liquide est tout à fait le même que celui de la diarrhée riziforme dans le choléra humain. Le liquide est toujours alcalin ; lorsqu'il est transparent, il ne se trouble pas, chauffé à 100°. Dans le côlon et le rectum, on le retrouve avec les mêmes particularités, mais quelquefois ces parties de l'intestin renferment plus de mucus que le cœcum.

Ce tableau anatomique est tellement net et prononcé qu'on

le reconnaît déjà après avoir rabattu la peau de l'abdomen. A travers les muscles, on distingue le côlon rempli de liquide, et une partie de l'intestin grêle congestionné. En appuyant le doigt sur l'abdomen, on sent le mouvement du liquide et on perçoit le bruit dû à son écoulement. La quantité de liquide dans le cœcum est si considérable, même dans des cas où la diarrhée était très forte pendant la maladie, qu'il faut supposer une certaine action paralysante du virus cholérique sur la musculature intestinale.

L'étude microscopique et microbique corrobore de son côté le caractère cholérique de la maladie des lapins. Nous avons déjà mentionné la fréquence des vibrions cholériques dans les déjections diarrhéiques de ces animaux. Le contenu de l'estomac ne renferme que rarement des vibrions ; quelquefois j'ai pu en constater un grand nombre dans l'estomac de réaction nettement acide. C'est l'intestin grêle qui est le siège principal des vibrions cholériques. Le liquide muqueux qui le remplit en renferme de telles quantités, qu'on en voit des masses sans mélange d'aucun autre microbe. Le contenu de l'intestin grêle, semé sur différents milieux nutritifs, donne dans la grande majorité des cas des cultures pures de vibrion cholérique. Quelquefois il s'y associe un petit nombre d'autres bactéries. Lorsque le choléra se prolonge d'une façon anormale, la quantité de ces bactéries étrangères devient plus considérable.

Le contenu du cœcum renferme également de grandes quantités de vibrions cholériques. Mais à côté d'eux, il y a toujours plusieurs autres espèces bactériennes en quantité variable. Des ensemencements avec le liquide cœcal donnent plus rarement des cultures pures de bacilles-virgules. On trouve toujours avec eux d'autres bactéries, comme les bacilles coliformes et souvent de gros bacilles avec des endospores ovales.

Le vibrion cholérique se localise principalement dans l'intestin grêle, et pénètre régulièrement dans le gros intestin, mais rarement dans l'estomac. En dehors de l'intestin, il se rencontre le plus souvent dans la vésicule biliaire. Sur seize cas, examinés sous ce rapport, la bile a donné des cultures de vibrions 8 fois (50 0/0). La pénétration dans le foie est plus rare : sur 24 cas, les vibrions ont été obtenus en culture dans 8 (33 0/0). Il est très probable que c'est dans les voies biliaires du foie que résident

les microbes cholériques. La généralisation de ces derniers dans le sang a été observée dans un quart des cas étudiés. Sur 48 lapins, examinés sous ce rapport, 12 (c'est-à-dire 25 0/0) ont donné des cultures du vibrion cholérique avec le sang du cœur. Ces exemples se trouvent répartis parmi les cas de choléra de courte durée, aussi bien que parmi ceux qui ont duré plusieurs jours.

Le plus souvent (75 0/0), le vibrion cholérique reste donc localisé dans l'appareil digestif et ses annexes (foie). La généralisation des microbes favorisants n'a été observée que dans des cas exceptionnels. Le plus souvent on ne pouvait retrouver ni au microscope, ni à l'aide de cultures, aucun des trois microbes ingérés avec le choléra. La torula ne s'est jamais généralisée, la sarcine n'a été retrouvée qu'une fois dans la bile, et une autre fois dans le sang du cœur.

L'examen des coupes confirme la localisation du processus cholérique dans l'intestin grêle. Lorsqu'on étudie les coupes de cet organe, enlevé sur des lapins morts du choléra, on est frappé par la destruction de la muqueuse (Pl. XI, fig. 1, 2). Des villosités entièrement dénudées font saillie dans la lumière intestinale, montrant leurs vaisseaux sanguins congestionnés à un très haut degré. L'épithélium se desquame par grands lambeaux, ou bien des cellules isolées se détachent et tombent dans le contenu intestinal. Le tout est mélangé avec une mucosité dans laquelle on trouve des amas de vibrions cholériques, parfois très considérables.

La réaction leucocytaire est en général faible. Quelquefois on trouve une quantité de leucocytes au-dessus de la normale dans les vaisseaux hyperémiés. Le nombre des leucocytes émigrés dans la muqueuse est petit.

Dans les cas qui constituent la règle, les vibrions restent localisés dans le contenu et la muqueuse de l'intestin. Lorsqu'il y a généralisation du vibrion, on le trouve dans la couche péritonéale et dans le sang des organes.

L'étude histologique du foie et des reins n'a révélé que des altérations peu constantes et secondaires. Les lésions rénales, si souvent décrites chez l'homme, n'ont pu être retrouvées chez les lapins cholériques.

Pour me faire une idée sur le développement du processus cholérique, si caractéristique chez les jeunes lapins, j'en ai sacrifié plusieurs à différentes périodes après l'absorption du

virus. Pendant les premières heures de l'expérience, l'examen microscopique ne révèle rien d'anormal. L'estomac, rempli de lait coagulé, garde sa réaction acide, ce qui n'empêche pas les vibrions de pénétrer dans l'intestin. Celui-ci, à partir de quatre heures après l'absorption du virus, présente déjà une congestion assez marquée. Chez un lapin, sacrifié 16 heures après qu'il avait avalé une culture de vibrion de Massaouah, associée avec celles de la torula, de la sarcine et du bacille coliforme de l'estomac humain, le tableau microscopique présentait déjà les traits principaux du choléra intestinal. L'intestin grêle, hyperémié à un degré moyen (nulle part de teinte hortensia), était distendu par un contenu liquide couleur d'ocre. Le cœcum et les autres parties du gros intestin, non congestionnés, étaient remplis d'un liquide trouble.

L'examen bactériologique montra la présence d'un petit nombre de vibrions cholériques dans l'estomac (de réaction toujours acide), mais en révéla une grande quantité dans l'iléum, le cœcum et le rectum. Ensemencé dans différents milieux nutritifs (plaques de gélose, eau peptonisée) le contenu de ces organes donna déjà, au bout de 3 heures 1/2, des cultures abondantes du vibrion de Massaouah. Mais, tandis que celui-ci s'installait si fortement dans les intestins, les microbes favorisants n'ont pu être retrouvés que dans les premières heures du processus. Il faut admettre que leur rôle consiste à favoriser les premiers moments de la vie parasitaire du vibrion; une fois que ce dernier a pris possession du terrain, les microbes favorisants deviennent inutiles, de sorte que leur disparition n'empêche pas la continuation du processus cholérique. Comme il a été mentionné plus haut, ce n'est que dans des cas exceptionnels que quelques-uns parmi ces microbes favorisants persistent, et même se généralisent dans l'organisme.

Des coupes de l'intestin grêle du lapin, sacrifié après 16 heures, nous apprennent que, malgré la pullulation des vibrions, l'épithélium reste encore intact. (Pl. XI, fig. 3.) Et cependant le commencement de l'empoisonnement s'est déjà fait et se manifeste par une hyperémie marquée de l'intestin grêle, et par une exsudation du liquide dans l'iléum et le cœcum.

Comme nous l'avons indiqué plus haut, le vibrion cholérique pénètre à l'état vivant à travers l'estomac acide, même sans le

secours d'autres microbes. L'action favorisante de ces derniers se manifeste peut-être en ce sens qu'ils facilitent la production de toxines par le vibrion, et lui permettent de prendre le dessus sur les microbes du canal digestif. Ces points devront être élucidés par des recherches ultérieures. Mais il reste certain que, dans cette association microbienne, il ne s'agit pas d'une infection mixte, mais bien de quelque chose d'analogue avec ce qui a été établi par M. Vaillard et ses collaborateurs au sujet du tétanos. Le vibrion de Koch est tout aussi bien le microbe spécifique du choléra, que le bacille de Nicolaier est l'agent producteur du tétanos. Comme ce dernier trouve de la part des phagocytes un grand obstacle à sa germination, le concours de certains microbes lui est nécessaire pour manifester ses propriétés pathogènes. Mais une fois que le bacille du tétanos a commencé à se développer, les bactéries favorisantes deviennent inutiles, et tout le processus tétanique proprement dit est l'œuvre unique du microbe spécifique. Le vibrion de Koch se heurte aussi à des obstacles dans le canal digestif, et utilise quelque action favorisante des microbes associés pour les franchir et pour développer son pouvoir cholérigène, conservant toujours le monopole d'être le microbe spécifique du choléra intestinal. Les microbes favorisants s'effacent aussitôt qu'ils ont accompli leur rôle, et on ne les trouve plus ni dans le contenu de l'intestin ni dans les déjections.

Ce n'est qu'à une période plus avancée de la maladie que la toxine cholérique, élaborée dans l'intestin, altère la muqueuse et produit la desquamation de l'épithélium. Quelquefois on trouve, même chez des lapins morts du choléra, des lésions intestinales peu prononcées. Il y a donc lieu de considérer le processus du choléra intestinal des jeunes lapins comme une intoxication par des vibrions développés dans le contenu des intestins. Malgré la sensibilité de ces animaux pour le virus cholérique, celui-ci ne se généralise pas dans l'organisme, au moins dans la grande majorité des cas. Il s'agit donc d'une intoxication consécutive à l'infection du tube digestif par le vibrion de Koch.

On a plusieurs fois observé, et c'est surtout M. Sobernheim [1] qui a fourni des données probantes, que, pour obtenir le choléra intestinal des cobayes d'après le procédé de M. Koch (alcalinisation de

1. *Zeitschr. f. Hygiene*, 1393, t. XIV, p. 4)1.

l'estomac et teinture d'opium), il fallait employer à peu près la même dose de virus vivant que celle qui est nécessaire pour empoisonner le cobaye avec des vibrions préalablement tués. Dans ce cas, il n'y a donc pas d'infection du tube digestif proprement dit, et il s'agit simplement d'une intoxication avec le virus, introduit à l'état vivant. Le choléra intestinal des jeunes lapins est bien différent sous ce rapport. Quoique je me sois servi toujours au moins d'une culture entière, développée sur la surface de la gélose [1], des quantités de vibrions beaucoup plus petits suffisent déjà pour donner le choléra intestinal à de jeunes lapins. Je n'ai pas eu besoin de faire des expériences particulières sur cette question, parce que dans le courant de mes recherches j'ai eu occasion de la résoudre bien facilement. Il se produit assez souvent une contamination spontanée de jeunes lapins. Lorsque, dans une nichée de lapins, on ne donne à manger les microbes (le vibrion cholérique avec les favorisants) qu'à quelques lapins, certains autres de la même portée prennent le choléra spontané. La contamination se fait évidemment par l'intermédiaire des mamelles, souillées par les microbes, absorbés par quelques-uns des jeunes. L'examen bactériologique de la cavité buccale de ceux d'entre eux qui ont consommé les microbes, examen pratiqué quelques heures après le début de l'expérience, démontre la présence d'une quantité de vibrions cholériques, ainsi que de microbes favorisants. Tétant la mamelle, les lapins déposent ainsi une partie de leur flore buccale, qui est ensuite absorbée par leurs frères n'ayant pas servi à l'expérience. J'ai observé treize cas de contamination spontanée, contractée de cette façon. Les quantités de virus et de microbes favorisants qui ont amené ce résultat ont dû être très petites. La maladie ne présentait aucune particularité, et était le tableau fidèle du choléra expérimental. Je dois ajouter que ces cas de contagion spontanée se sont produits au moment de la plus grande chaleur, aux mois de juin et de juillet.

La majeure partie de mes expériences a été faite avec le vibrion de Massaouah, parce qu'il est le plus virulent de toutes les variétés dont je disposais pour le moment. Mais comme on a exprimé des doutes sur le caractère cholérigène de ce microbe,

1. Dans toutes les expériences de ce mémoire, je me servais de gélose inclinée dans des tubes de 13,5 cm. de longeur et de 1,3 cm. de diamètre.

j'ai dû m'adresser à une race en dehors de tout soupçon. Dans ce but, j'ai choisi le vibrion isolé des selles du choléra expérimental de l'homme décrit dans le premier chapitre, choléra provoqué par l'ingestion du vibrion de Versailles (Seine). Il avait l'avantage, sur celui du choléra de Paris 1884, d'être virulent pour les cobayes.

Le vibrion de Versailles, ingéré avec les trois microbes favorisants, par cinq lapins de 4 à 7 jours, leur a donné un choléra intestinal mortel, des plus typiques sous tous les rapports. La seule différence avec le choléra produit par le vibrion de Massaouah consistait en ceci, que le liquide du cœcum était transparent et clair comme de l'eau, tandis que, avec le vibrion de Massaouah, ce liquide est plus trouble. Le vibrion de Versailles s'est montré très envahissant, et a donné le choléra mortel à quatre autres lapins de la même nichée auquels je n'avais fait ingérer aucune culture. Deux autres lapins de la même portée, dont un reçut par voie buccale les microbes favorisants avec une culture du vibrion de Finkler et Prior, tandis que l'autre absorba les microbes favorisants avec le vibrion de Deneke, moururent du choléra intestinal typique, cinq et quatre jours après le début de l'expérience. Seulement, à l'autopsie, il a été facile de démontrer que cette maladie a été provoquée, non par les vibrions de Finkler et Prior et de Deneke, mais bien par celui de Versailles, facilement reconnaissable à sa forme mince et à la réaction indol-nitreuse intense dans des cultures. Cette expérience, qui démontre encore une fois la facilité avec laquelle se fait la contagion spontanée, indique qu'il ne faut pas se servir de lapins de la même nichée pour les expériences sur l'absorption de différents microbes.

Le choléra intestinal peut être facilement obtenu, tant que les lapins ne se nourrissent que du lait de la mère. A partir du moment où ils commencent à manger du fourrage, le résultat devient très incertain, et bientôt s'établit une immunité que, jusqu'à présent, je n'ai pu vaincre avec aucun des microbes favorisants connus. Une de me lapines se distinguait par l'habitude de manger ses petits, aussitôt qu'elle les voyait très malades. Plusieurs ont pu être retirés dans un état suffisant pour que je puisse constater le choléra intestinal. Trois autres, soumis à la même expérience, ont été dévorés par la mère. Je cite ce cas

pour signaler que ce repas n'a aucunement altéré la santé de la lapine, et ne lui a pas causé la moindre diarrhée.

Une expérience dans laquelle j'ai donné à avaler à un jeune lapin plusieurs gouttes du contenu du cœcum d'un lapin mort du choléra intestinal, sans ajouter les microbes favorisants, n'a donné qu'un résultat négatif. Et cependant le contenu du cœcum renfermait des quantités de vibrions de Massaouah.

Les jeunes lapins qui ne se nourrissent que de lait de lapine, prennent le choléra intestinal, par voie buccale, sans alcalisation du suc gastrique. La maladie est provoquée par le vibrion cholérique, dont l'action est secondée par des microbes favorisants. Ce choléra des lapins, malgré l'absence de certains symptômes cliniques (vomissements, crampes, albuminurie), présente cependant une grande analogie avec le choléra humain. C'est une affection de l'intestin grêle, caractérisée par l'empoisonnement au moyen des toxines vibrionniennes, élaborées dans le contenu intestinal. Le choléra des jeunes lapins est contagieux, et peut se transmettre à l'aide des mamelles de la mère, souillées par des microbes.

VII

LE CHOLÉRA INTESTINAL DES JEUNES COBAYES.

Le cobaye, cette espèce si sensible au vibrion cholérique introduit dans la cavité péritonéale, est notablement plus résistant que le lapin contre le choléra intestinal. Comme il serait difficile d'attribuer cette immunité relative à des propriétés des tissus, il est beaucoup plus probable qu'elle est en rapport avec le genre de vie des jeunes cobayes. Dès le premier ou le second jour après la naissance, ils commencent à se nourrir de végétaux, ce qui enrichit leur flore intestinale d'une façon très notable. L'influence de ces microbes doit être la cause des irrégularités, dans la marche du choléra intestinal observé chez le cobaye : c'est elle qui empêche si souvent le dévelopement de cette maladie. Je dois prévenir le lecteur que tous les cas de choléra intestinal que j'ai observés chez les jeunes cobayes ont été obtenus avec le vibrion de Massaouah. Celles de mes expériences, dans lesquelles je m'étais servi du vibrion de Versailles (Seine), n'ont abouti à aucun résultat positif.

Il est très difficile d'obtenir le choléra intestinal des jeunes cobayes (d'un ou quelques jours de vie) avec le vibrion de Massaouah seul. Dans la très grande majorité de mes expériences, je l'ai donc combiné avec des microbes favorisants qui m'ont servi pour des lapins. J'ai fait toute sorte de combinaisons, dont la meilleure est encore celle qui a été appliquée pour les lapins (torula, sarcine et bacille lactique de l'estomac).

Sur 19 jeunes cobayes traités de cette façon, treize seulement sont morts du choléra intestinal, et cela malgré l'absorption d'une quantité de vibrions double de celle donnée aux lapins. Cette maladie qui se contracte si difficilement présente aussi des caractères moins prononcés et moins typiques. La diarrhée ne se développe que rarement. Jamais je n'ai observé de vomissements, ni de crampes, ni d'albuminurie. Les cobayes s'affaiblissent notablement, leur température baisse, les poils se hérissent et les parties nues deviennent cyanotiques. L'agonie est souvent très prolongée.

Le tableau pathologo-anatomique diffère de celui offert par les lapins en ce que les lésions intestinales sont moins prononcées, tandis que l'estomac est affecté dans le plus grand nombre des cas. Sa paroi est fortement congestionnée ; le contenu liquide, de réaction alcaline, renferme des quantités de vibrions. On voit bien que ce sont ces microbes qui provoquent la maladie. Lorsqu'ils résident en grand nombre dans l'estomac, c'est cet organe qui est le plus atteint; lorsqu'au contraire ils se logent dans l'intestin grêle, c'est celui-ci qui est le plus hypérémié. Le cœcum, non congestionné, renferme le plus souvent des quantités de vibrions, mélangés avec d'autres microbes. Le contenu cœcal est quelquefois liquide et couleur d'ocre : dans d'autres cas il se rapproche de l'état normal.

Les cultures sur plaques de gélose et dans l'eau peptonisée, faites avec les organes digestifs des cobayes cholériques, ont donné des vibrions de Massaouah en abondance. Le contenu stomacal donnait souvent des cultures pures ou presque pures de ce microbe. Une fois j'ai obtenu des colonies de la torula ingérée, et très souvent des colonies de bacilles de l'intestin. L'intestin grêle donne le plus souvent des cultures pures du vibrion de Massaouah, tandis que l'ensemencement du contenu cœcal donne ce vibrion associé à un certain nombre d'autres microbes.

Chez les jeunes cobayes, le tableau anatomique du choléra intestinal est donc beaucoup moins prononcé que chez les lapins. Par contre la généralisation du vibrion cholérique est beaucoup plus fréquente chez le premier. Sur 18 cas, étudiés sous ce rapport, 13 fois le sang du cœur a donné des cultures pures de vibrion de Massaouah.

Le fait que chez deux représentants du même ordre des rongeurs, le choléra, provoqué par le même microbe, s'accompagne de différences spécifiques, pourra faire comprendre l'absence de certains symptômes cliniques et la présence de certaines particularités anatomiques signalées dans le choléra des lapins, comparé à celui de l'homme. Des différences analogues s'observent aussi dans d'autres maladies infectieuses.

Des souris, âgées de sept jours, ne prennent pas le choléra, malgré l'ingestion des vibrions de Massaouah avec les trois microbes favorisants. Deux petits chiens, de la même portée que ceux qui ont été mentionnés dans le chapitre V, ont avalé deux cultures de vibrion de Massaouah sur gélose, avec les trois microbes favorisants. Les animaux continuèrent à se bien porter, et l'un d'eux a été sacrifié 15 jours après le début de l'expérience. Les vibrions de Massaouah ont été retrouvés en grande quantité dans le contenu du rectum, et ont donné des cultures typiques dans l'eau peptonisée. Ces microbes ont donc pu traverser l'estomac très acide et se fixer dans le tube digestif, sans avoir provoqué le moindre trouble.

Les cobayes, âgés de quelques jours, sont sensibles à l'action du vibrion de Massaouah ingéré avec les microbes favorisants. Le choléra intestinal, ainsi provoqué, est moins caractéristique que celui des jeunes lapins. Les jeunes cobayes prennent plus difficilement que les lapins le choléra intestinal, mais le vibrion cholérique a une tendance plus grande à se généraliser dans l'organisme du cobaye.

VIII

TENTATIVES POUR EMPÊCHER LE CHOLÉRA INTESTINAL DES JEUNES RONGEURS.

A. *Vaccination avec des cultures stérilisées.*

L'opinion des auteurs qui se sont occupés de la vaccination des cobayes contre le choléra, donné par l'estomac d'après la méthode de M. Koch, est, comme on sait, très divisée. Tandis

qu'un certain nombre d'expérimentateurs (MM. Gamaleïa, Brieger, Kitasato et Wassermann, Hafkine, G. Klemperer) affirment la possibilité de vacciner, par des inoculations préventives, les cobayes contre cette forme d'intoxication intestinale, plusieurs savants se sont prononcés récemment en sens contraire. MM. Pfeiffer et Wassermann[1] et, indépendamment d'eux, M. Sobernheim[2], sont arrivés à la même conclusion, à savoir que les cobayes, vaccinés contre la péritonite cholérique, ne le sont pas contre le choléra provoqué par la méthode de M. Koch. Comme dans ce procédé on a recours à la teinture d'opium, on pourrait objecter que cette substance agit comme poison sur les éléments cellulaires, et empêche la manifestation de l'immunité acquise. Cette supposition a pu être confirmée par les recherches récentes de M. Cantacuzène[3]. Il a vu des cobayes bien vaccinés mourir à la suite d'injection intrapéritonéale des vibrions, accompagnée d'une dose non mortelle de la teinture d'opium.

Dans ses recherches sur le choléra intestinal des spermophiles, obtenu sans intervention de l'opium, M. Zabolotny signale le fait que les spermophiles, vaccinés par voie sous-cutanée ou péritonéale, ne sont pas protégés contre le choléra intestinal.

Pour mes expériences de vaccination avec des cultures stérilisées, je me suis servi d'une culture de vibrion de Massaouah en bouillon peptonisé, développée pendant un mois à 36°, stérilisée à 120° et maintenue pendant 50 jours au laboratoire. Des quantités infinitésimales de ces cultures suffisent pour vacciner des cobayes. Aussi, parallèlement à la vaccination des jeunes lapins, j'ai pratiqué celle des cobayes adultes contre la péritonite cholérique. Trois cobayes vaccinés et deux témoins ont été éprouvés avec des doses sûrement mortelles de virus. Les témoins mouraient avec une généralisation des vibrions : les trois vaccinés résistèrent parfaitement bien.

Un lapin de 4 jours reçut dans le tissu sous-cutané 0,1 c. c. de la culture mentionnée, mélangée avec 0,5 c. c. de bouillon. Le lendemain, le même lapin et un autre, âgé de 5 jours, reçurent la même dose de la même culture. 3 jours après, je leur injectai 0,1 c. c. de culture de Massaouah

1. *Zeitschr. f. Hygiene*, t. XIV, 1893, p. 60.
2. *Ibid*, p. 499.
3. Mode de destruction du vibrion cholérique, 1894, p 154.

stérilisée à 120°. 2 jours plus tard ils reçurent encore 0,2 c. c. de la même culture. En tout le premier lapin reçut 0,5 c. c. et le second 0,4 c. c. de toxines. 3 jours après la dernière dose vaccinale, je leur ai donné, ainsi qu'à un lapin (témoin) de la même nichée, à avaler une culture sur gélose du vibrion de Massaouah et des 3 microbes favorisants (torula, sarcine et bacille coliforme de l'estomac). 2 jours plus tard les 3 lapins avalent encore une culture des microbes favorisants. Le lapin, qui avait reçu 0,5 c. c. de toxines, tomba malade le premier. 4 jours après l'ingestion des vibrions, et 13 jours après la première dose vaccinale, il se déclara chez lui une diarrhée riziforme ; les flocons de mucus renfermaient le vibrion sans autres microbes. La faiblesse était très prononcée. T. 36°. Le lendemain matin ce lapin a été trouvé mort. L'autopsie révéla le choléra typique. Le sang du cœur n'a pas donné de cultures; mais le contenu de l'iléum et du cœcum, ainsi que le liquide de la diarrhée ont donné des cultures abondantes et presque pures du vibrion de Massaouah. Le lapin témoin est mort un jour après le premier vacciné, avec des signes du choléra intestinal des plus typiques. Le second vacciné a vécu 11 jours de plus que le témoin. Il est mort avec des signes de choléra peu prononcés, et cependant le contenu de son cœcum a donné une culture pure du vibrion de Massaouah.

Dans une seconde expérience, semblable à la première, les doses vaccinales des deux lapins ont atteint 0,4 c. c. de culture stérilisée (injection sous-cutanée). 2 jours après la dernière dose vaccinale, les deux lapins, ainsi qu'un témoin (de la même nichée) avalèrent une culture de vibrion de Massaouah avec les trois microbes favorisants. 2 jours plus tard cette dose a été renouvelée pour un des vaccinés et le témoin. 3 jours après la première ingestion des microbes, un des vaccinés mourut. Atteint d'une diarrhée très forte, il a succombé avec les signes typiques du choléra intestinal sans généralisation dans le sang. Le contenu des intestins, comme le liquide diarrhéique, ont donné des cultures abondantes du vibrion de Massaouah. 1 jour après mourut le second vacciné, également avec la diarrhée et des signes du choléra intestinal des plus caractéristiques. Le témoin, bien qu'il ait avalé deux fois plus de virus que le premier vacciné, a survécu et se porte très bien. Il est un des deux lapins (sur 22) qui ont résisté au vibrion, associé avec les microbes favorisants.

Les cultures stérilisées du vibrion de Massaouah, qui ont si facilement préservé trois cobayes contre la péritonite cholérique[1], *n'ont pas empêché quatre jeunes lapins de mourir du choléra, contre lequel a résisté un des deux témoins.*

B. *Vaccination avec des cultures vivantes.*

Les cultures vivantes de vibrion de Massaouah sont vaccinantes contre la péritonite cholérique des cobayes et des lapins :

1. Les cobayes ont été vaccinés dans le tissu sous-cutané avec à peu près les mêmes doses de cultures stérilisées, par rapport au poids.

1/250e d'une culture sur gélose et quelquefois même une moindre quantité suffisent pour vacciner un cobaye adulte. Dans l'expérience que je suis obligé de rapporter avec quelques détails, je vaccinai mes animaux (jeunes lapins et cobayes adultes) par des injections sous-cutanées de cultures vivantes. La vaccination était commencée sur des lapins âgés de 3 jours et tous de la même nichée. Chaque animal reçut deux doses vaccinales.

Deux petits lapins, nos 1 et 2 (poids 45 et 68 grammes), reçurent sous la peau de la cuisse 1/64e d'une culture de vibrion de Massaouah sur gélose, développée pendant 24 heures à 36° et conservée pendant 35 jours au laboratoire; deux autres nos 3 et 4 (de 57 et 54 grammes) reçurent en même temps 1/32e de la même culture, sous la peau du ventre. Un cobaye (poids 245 grammes) reçut sous la peau du ventre 1/32, et un autre (de 245 grammes) 1/16e de la même culture. 4 jours après, les quatre lapins cités reçurent sous la peau du ventre 1/16e d'une culture vivante de Massaouah, développée pendant 17 heures à 36°. Les deux cobayes déjà mentionnés, ainsi qu'un troisième, reçurent également sous la peau du ventre 0,1 c. c. de la même culture. Ces derniers ont été éprouvés avec une dose plus que mortelle du virus : 54 heures après la seconde injection vaccinale, deux cobayes vaccinés ainsi qu'un témoin neuf (de 270 grammes) reçurent un dixième de culture sur gélose inclinée, développée à 36° pendant 24 heures. Le témoin mourut dans la nuit avec une masse de vibrions libres dans l'exsudat péritonéal; les cobayes vaccinés ont parfaitement résisté à l'épreuve. 3 jours après la seconde injection vaccinale, le troisième cobaye avec deux témoins (de 268 et 310 grammes) reçurent 0,1 de culture de vibrion de Massaouah sur gélose. Les deux témoins moururent dans la nuit avec des quantités de vibrions libres dans l'exsudat péritonéal (le sang des trois cobayes témoins a donné des cultures du vibrion de Massaouah; le cobaye vacciné est resté bien portant. Quoique vaccinés (par rapport au poids), avec des doses beaucoup plus faibles que les quatre lapins, les cobayes se sont donc montrés parfaitement résistants.

Trois jours après la seconde dose vaccinale, deux des lapins (nos 1 et 2), ainsi que deux témoins de la même nichée, ont avalé une culture de vibrion de Massaouah, développée sur gélose (à 36°) pendant 24 heures, avec les trois microbes favorisants. Deux jours plus tard, ils avalèrent encore une culture des microbes favorisants, sans le vibrion de Massaouah. Le troisième jour après cette dose, le premier des lapins vaccinés a été pris de diarrhée cholérique qui s'accentua le lendemain. La température (37°,3), voisine de la normale le premier jour de la maladie, tomba le lendemain jusqu'à 34°. Le jour suivant, la diarrhée et la faiblesse devinrent encore plus grandes, et la température baissa à 33°,7, puis à 31°,5. Le lapin vécut cependant encore et ne mourut que le lendemain avec une longue agonie et une température de 27°,5. L'autopsie révéla le choléra intestinal typique. Le contenu de l'iléum et du cœcum, fortement dilatés par le liquide diarrhéique

donna des cultures abondantes du vibrion, auquel était mélangé un certain nombre de bacilles. Le sang et la bile demeurèrent stériles.

Un des lapins témoins fut pris de diarrhée le lendemain après la mort du premier vacciné. Il mourut deux jours après ce dernier, du choléra intestinal typique.

Le second des vaccinés tomba malade le jour de la mort du premier témoin. Il se déclara chez lui une diarrhée, accompagnée de grande faiblesse. Le liquide diarrhéique, comme c'est la règle, renfermait beaucoup de vibrions de Massaouah, et donnait des cultures abondantes de ce microbe. Le lendemain, la diarrhée diminua et l'état général s'améliora (T. 37°,0; 36°,7; 36°,5; 37°,0); mais le surlendemain les symptômes s'aggravèrent, la température baissa à 34°,3 et le lapin mourut le jour suivant, après une longue agonie. L'autopsie révéla les lésions typiques du choléra intestinal : la partie supérieure de l'intestin grêle très congestionnée, le cœcum fortement dilaté avec une grande quantité de liquide, fournissant par culture des quantités de vibrions de Massaouah. Le sang, la bile et le foie n'ont donné aucune culture, mais le rein a produit dans de l'eau peptonisée un voile avec du vibrion de Massaouah.

Le second témoin a eu un peu de diarrhée, sans aucun trouble général, et est resté bien portant.

Cinq jours après la seconde injection vaccinale, les deux lapins n°s 3 et 4 ont avalé une culture des microbes favorisants et une culture du vibrion de Massaouah. Les mêmes microbes et en même quantité ont été absorbés par un lapin neuf de la même nichée (témoin).

Le lendemain un des vaccinés (le n° 4) a été pris de diarrhée très forte, accompagnée de faiblesse et d'hypothermie (34°,3). Il est mort dans la nuit, avec des signes du choléra intestinal (partie supérieure de l'intestin grêle couleur hortensia, cœcum très dilaté par la sérosité diarrhéique). L'iléum et le cœcum ont donné des cultures presque pures du vibrion de Massaouah, tandis que le sang du cœur, la bile et le foie se sont montrés stériles.

Le lendemain de la mort de ce lapin, le témoin mourut, également avec des signes de choléra intestinal bien caractéristique.

Le second des vaccinés (n° 3) est resté bien portant.

Dans l'expérience avec les vaccins vivants, ceux-ci ne se sont pas montrés plus efficaces que les cultures stérilisées. Sur quatre lapins vaccinés, un a définitivement résisté, mais, des trois témoins, un a survécu également, et cela sans aucune vaccination ou traitement.

Comme nous l'avons vu, le choléra intestinal des lapins est un empoisonnement par les toxines préparées dans le canal digestif. Or, comme cela a été démontré dans plusieurs travaux, la vaccination ne protège pas contre l'intoxication de l'organisme. Il est donc facile de concevoir *a priori* qu'un animal, très bien vacciné contre le vibrion cholérique introduit dans les tissus,

peut ne pas résister à l'intoxication par un poison préparé dans le contenu intestinal.

C. Vaccination avec le sérum préventif.

Les expériences relatées dans le chapitre précédent ont donné un résultat, concordant avec l'avis des auteurs qui concluent à l'inefficacité de la vaccination par des cultures vivantes ou stérilisées contre le choléra intestinal, provoqué par la méthode de M. Koch. Dans le mémoire où ils traitent ce sujet, MM. Pfeiffer et Wassermann arrivent à la même conclusion par rapport à la prévention contre cette maladie expérimentale avec le sérum très actif, provenant d'une personne guérie du choléra. Tandis que des doses très faibles de ce liquide suffisaient déjà pour empêcher la péritonite cholérique chez des cobayes, des quantités considérables (jusqu'à 5 c. c.) étaient impuissantes pour vacciner ces animaux contre l'infection par la méthode de Koch.

Dans une expérience d'orientation, j'ai fait avaler à deux jeunes lapins, âgés de quatre jours, une culture du bacille coliforme de l'estomac et une culture du vibrion de Massaouah (toutes deux développées sur gélose à 35° pendant 24 heures). Un des lapins servait de témoin, tandis que l'autre reçut, avant l'injection des microbes, une injection sous-cutanée d'un c. c. de sérum de lapin, dont 0,2 c. c. étaient suffisants (introduits dans le péritoine) pour protéger un cobaye adulte contre la péritonite cholérique.

Comme l'association des microbes ingérés ne produisait aucun effet, le surlendemain les deux lapins reçurent d'abord une demi-culture du bacille et une culture entière de vibrion de Massaouah. Mais l'effet fut encore nul, ce qui pouvait être expliqué par l'insuffisance de la flore favorisante : alors, j'ai donné à mes deux lapins, le quatrième jour de l'expérience, une culture de vibrion de Massaouah, cette fois associé avec les trois microbes favorisants. Le lendemain les lapins ont été pris de diarrhée, et mouraient le sixième jour de l'expérience avec tous les signes de choléra intestinal typique.

Bien que la mort simultanée du lapin traité et du témoin indiquât l'impuissance du sérum, on pouvait cependant l'expliquer par la grande quantité de virus absorbé. Dans une seconde expérience il a été tenu compte de cette circonstance.

Trois lapins, âgés de onze jours, reçurent dans le péritoine du sérum provenant d'un cobaye qui a résisté quatre fois au virus de Massaouah, et dont 1/2 c. c. protégeait bien les cobayes contre la péritonite cholérique. Les deux premiers lapins reçurent 0,5 c. c. et le troisième 0,33 c. c. de ce sérum : 25 heures après ils ont avalé, en même temps qu'un lapin témoin

de la même nichée, une culture de vibrion de Massaouah et un des trois microbes favorisants. Le témoin est mort le surlendemain avec tous les signes du choléra intestinal; les trois lapins, traités par le sérum, ont résisté définitivement.

Comme dans cette expérience l'effet préventif du sérum était manifeste, il a été nécessaire de poursuivre l'étude de cette question pour établir les conditions précises dans lesquelles il s'exerce.

Dans une nouvelle expérience, j'ai procédé avec un sérum de lapin qui a résisté trois fois à des doses du vibrion de Massaouah, dont la dernière était plus que suffisante pour tuer un lapin adulte, tandis que les deux premières étaient des doses minimales mortelles. Le sérum de ce lapin protégeait les cobayes neufs contre l'infection par le péritoine. Avec 0,5 c. c., injecté dans la cavité péritonéale, les cobayes étaient si bien vaccinés qu'ils supportaient le choléra péritonéal presque sans trouble. Un cobaye de 317 grammes, auquel j'ai injecté sous la peau 1 c. c. du sérum, résista parfaitement à une dose de culture de Massaouah qui tua le témoin (de 357gr.) en moins de 12 heures.

Comme les injections intrapéritonéales des jeunes lapins sont dangereuses à cause de la délicatesse des organes, et comme le tissu sous-cutané est chez eux très lâche, j'ai injecté sous la peau de deux lapins, âgés de huit jours, 0,75 c. c. (n° 1) et 0,5 c. c. (n° 2) du sérum mentionné. Le lendemain, juste 24 heures après, j'ai donné à avaler à ces deux lapins, ainsi qu'à quatre autres lapins de la même nichée (n°s 3 à 6), une culture des trois microbes favorisants et du vibrion de Massaouah (les cultures étaient développées sur gélose pendant 25 heures à 36°). Le lapin n° 3 reçut, aussitôt après, 1,2 c. c. du sérum préventif sous la peau, et le n° 4 = 1 c. c. du même sérum dans le péritoine.

Deux jours après l'ingestion des microbes, le lapin n° 1 (qui a reçu 24 heures au paravant 0,75 c. c. de sérum) a été pris d'une diarrhée très violente. Les déjections renfermaient du vibrion de Massaouah presque en culture pure. Ce lapin est mort 48 heures après l'injection des microbes. L'autopsie a confirmé le diagnostic de choléra intestinal typique. Les cultures ont démontré que le vibrion s'est développé à l'état de pureté du contenu de l'iléum, et qu'il ne s'était pas généralisé dans l'organisme : le sang et le foie demeurèrent stériles.

Tandis que le n° 1 n'avait absorbé qu'une seule culture des microbes, les trois autres lapins, traités par le sérum, et les deux témoins avaient avalé encore une fois une culture des trois microbes favorisants, avec le vibrion de Massaouah. Le surlendemain de cette injection, le lapin n° 3 (qui avait reçu 1, 2 c. c. de sérum) fut pris d'un choléra très violent, et mourut dans la journée. A l'autopsie, tous les signes du choléra intestinal furent constatés. L'étude bactériologique démontra cette fois aussi l'absence de généralisation

dans les organes. Le contenu de l'iléum donna une culture pure, celui du cœcum une culture presque pure de vibrion de Massaouah.

Le lendemain mourut le lapin n° 2 (0,5 c. c. de sérum 24 heures avant l'administration des microbes) après un choléra de courte durée et très violent. Diarrhée profuse. T. 30°. A l'autopsie : forte hyperémie de l'intestin grêle; par endroits teinte hortensia; le cœcum, non congestionné, renferme une grande quantité de liquide louche, ne donnant avec de l'acide sulfurique concentré que des traces de la réaction rose (indol-nitreuse.) Le contenu de l'iléum et du cœcum a donné des cultures pures du vibrion de Massaouah, le sang du cœur, le foie et le rein demeurèrent stériles.

Quatre jours après la seconde absorption des microbes favorisants, le dernier des lapins (n° 4) traités par le sérum (1 c. c. dans le péritoine), a été pris de choléra violent (diarrhée abondante, T. 28°,2) et mourut bientôt après. Inutile de dire que l'autopsie a confirmé le diagnostic. Il s'agissait encore d'un choléra localisé dans les intestins, sans généralisation de microbes dans le sang et les organes (foie et rein).

Ce n'est que deux jours après la mort du dernier des traités que se déclara la diarrhée chez les deux témoins. L'un d'eux mourut dans la journée d'un choléra typique, non généralisé. La maladie de l'autre dura quatre jours; après des périodes d'amélioration temporaire (cessation de la diarrhée, relèvement de la T. de 36° à 39°,9), le lapin mourut avec des signes pathologo-anatomiques du choléra, moins typique que chez tous les autres lapins de la même expérience. L'intestin grêle ne présentait qu'une faible hyperémie, les reins étaient très congestionnés par îlots, sans présenter de lésions anatomiques du tissu. Le contenu de l'iléum, du cœcum, ainsi que le parenchyme du foie donnèrent des cultures abondantes de vibrion de Massaouah.

Cette expérience a donc abouti à un résultat général tout opposé à celui de l'expérience précédente. Comme le choléra intestinal est une maladie plus compliquée que la péritonite provoquée par les vibrions, on conçoit facilement la plus grande irrégularité des conditions qui la commandent. *Les faits que je viens de citer ne permettent pas de conclure à une prévention efficace du choléra intestinal par le sérum des animaux vaccinés.*

D. Vaccination avec le sérum de cheval.

La seconde expérience avec le sérum préventif n'ayant donné aucun résultat encourageant, j'ai songé à appliquer comme moyen préventif le sérum de cheval normal. D'après MM. Pfeiffer et Issaeff [1], le sang de cet animal à l'état normal est préventif contre les bactéries cholériques, à un degré équi-

1. *Zeitsch. f. Hyg.*, t. XVII, p. 370.

valent à celui du sang des animaux immunisés contre le choléra. Or, il est évidemment plus facile à se procurer.

Afin de résoudre cette question, j'ai fait une expérience sur quatre lapins de la même portée, âgés de quatre jours. Deux d'entre eux (nos 1 et 2) reçurent sous la peau 1 c. c. de sérum d'un vieux cheval sain, sérum qui m'avait été donné par M. Nocard. Les deux autres (nos 3 et 4) reçurent 0,5 c. c. du même sérum sous la peau de la cuisse. 22 heures après, j'ai donné à avaler aux nos 1 et 2 une culture des trois microbes favorisants et du vibrion de Massaouah (les cultures étaient développés à 36° sur gélose pendant 25 heures.) La même dose a été prise par un lapin neuf (témoin) de la même nichée, n° 5. Le lendemain matin le lapin n° 1, traité par 1 c. c. de sérum, a été trouvé mort dans sa cage, avec tous les signes du choléra intestinal.

Un jour après mouraient les deux autres lapins de cette expérience : le n° 2, qui a reçu 1 c. c. de sérum, et le n° 5 — témoin. Chez les deux la maladie a présenté la forme du choléra sec.

Comme ces exemples montraient que même 1 c. c. de sérum était incapable de préserver les lapins, je me suis abstenu de donner à ingérer les microbes à deux autres lapins qui ne reçurent que 0,5 c. c. de sérum. Malgré cela, tous deux ont pris le choléra par voie d'infection spontanée. La mort a été précédée de la diarrhée chez le n° 3. A l'autopsie, je constatai : partie supérieure de l'intestin grêle de la teinte hortensia; cœcum et côlon distendus par le liquide diarrhéique. Le contenu de l'estomac, de réaction acide, renfermait du lait coagulé, mélangé avec un mucus verdâtre. Ensemencé dans l'eau peptonisée, ce contenu, ainsi que celui des intestins, a donné des quantités de vibrions de Massaouah. Par contre le sang, la bile et le foie sont demeurés stériles.

Le dernier des lapins, le n° 4, est mort du choléra sec. L'autopsie le démontra d'une façon indiscutable. Comme faits particuliers de ce cas, je dois signaler la généralisation du vibrion (culture pure du vibrion de Massaouah avec le sang du cœur) et la réaction indol-nitreuse bien nette (ce qui est très rare dans le choléra intestinal des lapins).

Comme le sérum de cheval normal était absolument incapable d'empêcher le choléra intestinal des jeunes lapins, je l'ai éprouvé sur un cobaye. 2 c. c. de ce sérum, injecté sous la peau d'un cobaye adulte, ne l'ont pas préservé contre la péritonite par le vibrion de Massaouah.

La question de savoir si cet échec est dû à l'absence d'une propriété préventive du sang de certains chevaux normaux, ou bien si la différence entre mes résultats et ceux de MM. Pfeiffer et Issaeff dépend de la qualité du virus employé (ces auteurs se sont servis du vibrion de Pfeiffer et moi de celui de Massaouah) ne pourra être résolue que par des recherches ultérieures.

L'expérience relatée prouve nettement l'incapacité du sérum de cheval normal pour empêcher le choléra intestinal des lapins provoqué

par le vibrion de Massaouah. Je me dispense donc de citer ici une seconde expérience, aboutissant à la même conclusion.

E. Tentatives pour empêcher le choléra à l'aide des microbes.

Dans les expériences de vaccination par les cultures ou de prévention par les sérums, le terrain était déjà très bien préparé par les recherches antérieures; au contraire, dans les tentatives pour empêcher le choléra avec des microbes, tout était à reprendre *ab ovo.* Voilà pourquoi les quelques données que je me propose de relater ne doivent être considérées que comme un début.

Un grand nombre de faits laissaient présumer qu'il existe dans la nature des microbes empêchant l'action pathogène du vibrion cholérique. L'influence de ces microbes pourrait être mise en cause comme facteur de la résistance de l'homme contre le choléra, si fréquente en général et surtout dans les localités indemnes; cette influence pourrait être invoquée aussi pour expliquer l'immunité si générale et si tenace des animaux.

Comme dans l'étude des microbes favorisants, j'ai commencé par examiner l'effet de certaines bactéries qui ont exercé dans les cultures une influence nuisible sur les vibrions. J'ai donné d'abord à avaler à un lapin, âgé de 6 jours, une culture de vibrion de Massaouah et plus tard une culture du bacille pyocyanique, du coccus blanc (mentionné dans le chap. IV) et d'un gros coccus, isolé des déjections de cobaye. Ces trois microbes se distinguaient par leur influence défavorable sur les vibrions, cultivés sur plaques de gélatine. Le lapin témoin de la même portée absorba une culture de vibrion de Massaouah avec les trois microbes favorisants. Ce dernier mourut dans la nuit du 3e au 4e jour de l'expérience, avec un choléra intestinal tout à fait typique. Le lapin qui absorba le vibrion de Massaouah avec les microbes empêchants, se porta très bien et fut sacrifié au quatrième jour après le début de l'expérience. A l'autopsie, les organes ont été trouvés à l'état absolument normal. Le contenu de l'estomac et de l'iléum donna des cultures pures du bacille pyocyanique; celui du cœcum développa un mélange du pyocyanique avec le vibrion de Massaouah. Cette expérience indiquait donc une influence empêchante des microbes sur le vibrion, qui était relégué jusque dans le rectum.

Dans une autre expérience, un lapin âgé de 4 jours absorba une culture de vibrion de Massaouah avec les trois microbes empêchants cités (bacille pyocyanique, coccus blanc, gros coccus des déjections de cobaye). Il resta bien portant pendant une semaine, après quoi il absorba une culture de trois microbes favorisants (torula, sarcine et bacille coliforme); deux jours après, il absorba encore une fois les mêmes microbes et une culture entière du Massaouah. Comme il continuait à se bien porter, je lui ai administré une nouvelle dose des mêmes microbes. Le lendemain il fut pris de diarrhée et mourut 3 jours après, c'est-à-dire 17 jours après la première prise des vibrions. L'autopsie révéla des lésions intestinales peu typiques pour le choléra. Le contenu de l'iléum et du cœcum donnait des cultures du Massaouah mélangé avec d'autres microbes.

Comme cette expérience, ainsi que plusieurs autres analogues, m'a montré que le bacille pyocyanique peut être lui-même pathogène pour les jeunes lapins qui l'avaient absorbé, je me suis décidé à l'exclure de mes recherches ultérieures. J'ai alors porté mon choix sur un bacille qui liquéfie la gélatine d'une façon extraordinaire, et qui donne, sur des plaques avec ce milieu nutritif, des colonies rondes semblables à une réunion de cristaux en forme de rayons. Ce bacille a été retrouvé en grande quantité dans des cultures du contenn intestinal d'un cobaye adulte, auquel j'avais donné à avaler du vibrion de Massaouah. Le cobaye se portait très bien et fut sacrifié 2 jours après l'absorption des vibrions. Les organes digestifs ont été trouvés intacts à l'autopsie, et leur contenu donna des cultures presque pures du bacille mentionné, que je désignerai sous le nom de *bacille liquéfiant du cobaye*. Le fait que cette bactérie a remplacé le vibrion de Massaouah, qui ne s'est pas du tout développé dans les cultures, ainsi que la circonstance qu'un bacille tout à fait semblable a été retrouvé par moi dans deux cas de guérison du choléra et de diarrhée cholériforme expérimentale chez l'homme, me suggérèrent l'idée de choisir le bacille liquéfiant du cobaye comme moyen d'empêcher le choléra intestinal.

La première expérience, entreprise avec le bacille liquéfiant, était très encourageante. Deux lapins de 4 jours ont avalé une culture (sur gélose à 36° pendant 24 h.) du vibrion de Massaouah, et une de ce bacillle. 9 jours après ils avalèrent encore une cul-

ture du Massaouah, cette fois avec les trois microbes favorisants. 4 jours après je leur donnai encore une fois le même mélange. Les deux lapins ont très bien résisté à cette épreuve.

Dans une seconde expérience, les conditions ont été modifiées de telle façon que les lapins (il s'agissait de 3 lapins de 10 jours) ont avalé, dès le début, une culture des trois microbes favorisants, et aussi une culture de Massaouah et du bacille liquéfiant du cobaye. Le surlendemain ils avalèrent encore une culture des microbes favorisants et du bacille liquéfiant. Deux des trois lapins reçurent encore deux fois des cultures de ce dernier, tandis que le troisième lapin en fut privé. Eh bien, celui-là seul prit le choléra, les deux autres résistèrent parfaitement.

Lorsque, dans les expériences ultérieures, j'ai voulu forcer les doses et administrer à mes lapins des quantités exagérées de vibrions, j'ai vu que l'influence empêchante du bacille liquéfiant s'effaçait de plus en plus. Mais, en général, il n'est point contestable que, soumis à l'action de ce bacille, les lapins résistent beaucoup mieux à l'influence pathogène des vibrions.

Une série d'expériences, entreprise avec de jeunes cobayes, m'a appris également que ces animaux résistent mieux au choléra si on leur donne à avaler le bacille liquéfiant. Comme ces recherches sont loin d'être terminées, je me contenterai de communiquer le résultat général de cette série. Sur 19 jeunes cobayes, auxquels j'ai donné à avaler des cultures de Massaouah, associées avec les trois microbes favorisants, 13 sont morts du choléra intestinal et 6 ont résisté (voir chap. VII). La majeure partie de ces animaux ont reçu cette combinaison de quatre microbes à deux reprises, chaque fois une culture entière, sur gélose, de chaque microbe. Sur 14 autres cobayes qui ont été traités de la même façon, mais auxquels j'ai administré en outre, chaque fois, une culture de bacille liquéfiant de cobaye, 5 seulement sont morts de choléra, tandis que 9 ont résisté définitivement. *Ces expériences démontrent clairement le grand rôle que jouent les microbes associés aux vibrions, dans la production du choléra ; elles indiquent aussi l'influence empêchante du bacille liquéfiant du cobaye sur l'activité cholérigène des vibrions.* Mais elles prouvent, en même temps, que le problème n'est pas encore

résolu d'une façon satisfaisante, et qu'il faut tâcher d'obtenir de meilleurs résultats dans la même voie.

Tandis que le bacille liquéfiant de cobaye manifeste une influence empêchante incontestable, un bacille liquéfiant aussi, mais différent du premier, bacille que j'ai retrouvé en quantité dans le rectum d'un des jeunes chiens qui ont résisté au choléra (voir p. 555), ne m'a donné sur des lapins jeunes qu'un résultat négatif. Des trois lapins de sept jours, qui avaient avalé une culture du vibrion de Massaouah avec les trois microbes favorisants et le bacille liquéfiant du chien, un est mort en 21 heures, les deux autres en 23 heures, tous trois d'un choléra intestinal des plus typiques. Le bacille du chien a donc exercé dans l'organisme des lapins une action favorisante sur les vibrions, au lieu d'empêcher le choléra.

IX

APPLICATION DES DONNÉES EXPÉRIMENTALES A L'ÉPIDÉMIOLOGIE DU CHOLÉRA.

Tout l'ensemble des données, exposées dans les précédents chapitres, démontre que le vibrion cholérique est bien sensible à l'action des microbes qui l'avoisinent. Cette influence de la flore microbienne pourrait être utilisée pour expliquer un grand nombre de faits d'épidémiologie, recueillis surtout par M. de Pettenkofer, et qui semblaient si souvent être en désaccord avec la découverte fondamentale de M. Koch, du bacille-virgule comme agent producteur du choléra.

L'épidémiologie nous apprend que certaines épidémies de choléra se distinguent par leur faible extension : les petits foyers cholériques s'éteignent d'eux-mêmes, sans aucune mesure sanitaire. Comme exemple je puis citer le choléra de Finten et Gonsenheim en 1886. Provoqué par des vibrions cholériques constatés chez des malades, le choléra n'a été reconnu que tout à fait à la fin de l'épidemie. Malgré l'absence de toutes précautions prophylactiques, celle-ci ne s'est pas propagée jusqu'à Mayence, la grande ville voisine, et s'est éteinte d'elle-même. Comme extrême opposé, on peut invoquer le choléra de 1892, qui a débuté dans plusieurs points éloignés entre eux, et s'est distingué par la rapidité de son extension. Pendant qu'il faisai

des ravages autour de la mer Caspienne, le choléra apparaît brusquement dans la banlieue de Paris, sans qu'on puisse établir son origine immédiate.

L'hypothèse de l'influence microbienne pourrait bien expliquer ces faits paradoxaux. Lorsque le vibrion cholérique pénètre dans le canal digestif, renfermant des microbes favorisants, la maladie se développe facilement, et donne lieu à une extension épidémique rapide. Lorsque, au contraire, les microbes favorisants sont en petit nombre, ou bien lorsque la flore des organes digestifs est riche en microbes empêchants, le choléra trouve un obstacle plus ou moins infranchissable, et ne donne lieu qu'à des petits foyers.

L'immunité locale passagère ou permanente, ainsi que l'immunité saisonnière, pourraient trouver la même explication. L'immunité de certains endroits, comme Versailles, ne pouvant plus être attribuée à l'impossibilité, pour le vibrion cholérique, d'y pénétrer et d'y vivre, pourrait être expliquée par l'absence, dans la flore du canal digestif des habitants, d'une quantité suffisante de microbes favorisants. Le vibrion cholérique pénètre bien dans ces localités indemnes, et les cas de choléra importé ne font défaut dans aucune épidémie ; mais le microbe spécifique, avalé par des habitants, dont la flore stomacale et intestinale lui est défavorable, ne produit pas le choléra.

Cette immunité locale qui ne peut pas être expliquée, au moins dans le cas que nous avons étudié, par l'absence totale du vibrion cholérique, ne peut non plus être attribuée à un état vacciné permanent des habitants.

La présence du vibrion cholérique dans les eaux à des époques où il n'y a pas d'épidémie cholérique (comme par exemple sa pullulation dans la Seine au printemps et à l'été de 1893) fait qui paraît si paradoxal au premier abord, peut se concilier également avec l'hypothèse de l'influence microbienne. Les vibrions de la Seine en 1893 n'ont pas provoqué d'épidémie, non pas parce qu'ils n'étaient pas assez virulents (les expériences directes, relatées dans les chapitres II et III, ont prouvé le contraire), mais bien parce que la flore microbienne des habitants était défavorable pour leur manifestation cholérigène.

On ne peut plus discuter sérieusement le rôle de l'eau comme véhicule du microbe cholérique. Dans sa polémique contre cette

théorie, M. de Pettenkofer et son école se rapportaient à des faits où l'extension de l'épidémie ne correspondait pas fidèlement à la distribution de l'eau potable. Les influences microbiennes peuvent expliquer cette contradiction. L'eau contaminée a pu importer des vibrions cholériques, sans que ceux-ci amènent le choléra, par suite de l'obstacle des microbes empêchants. Lorsque la flore des voies digestives est favorable pour le vibrion cholérique, l'extension épidémique du fléau est facile ; dans le cas contraire, il ne se produit que des cas isolés. Les influences microbiennes peuvent expliquer également des cas de choléra développés, à la suite de l'absorption de certaine nourriture qui par elle-même ne sert pas de véhicule au vibrion cholérique. Ainsi on a observé que des fruits, une bière mauvaise, etc., provoquaient des explosions cholériques.

Je n'invoque que l'influence de la flore des organes digestifs, parce que je ne peux pas chercher le facteur favorisant le choléra dans quelque microbe particulier, exotique et importé avec le vibrion. Les expériences où la culture pure de ce vibrion a provoqué le vrai choléra, ne permettent pas de penser autrement. Dans une de ses publications, M. Buchner [1], faisant des réflexions sur le caractère miasmatique du choléra, émet l'hypothèse de quelque microbe particulier, ressemblant à la coccidie malarique, qui jouerait le principale rôle. Dès mes premières recherches de 1892, j'ai dirigé mes observations vers ce point, en tenant compte de ce fait que, lors de la découverte de M. Koch, les coccidies malariques étaient encore peu connues. Mais, malgré l'emploi de toutes les méthodes propres à résoudre ce problème, je ne me suis assuré que de l'absence de tout microbe de ce genre dans le sang, aussi bien que dans les organes (intestin, foie, etc.). D'après la théorie de M. Nencki et de ses élèves, le choléra serait dû à une association du vibrion cholérique avec certaines autres bactéries spécifiques, auxquelles ils ont donné le nom de *Bacillus caspicus*. Ils essayent de prouver cette opinion par l'étude de la virulence des mélanges microbiens, injectés aux animaux par la voie péritonéale.

Les mêmes influences qui permettent ou empêchent le développement épidémique du choléra, peuvent agir dans des cas isolés. Dans le premier exemple de choléra expérimental chez

1. *Deutsche Vierteljahrschr. f. öffentl. Gesundheitspflege.* J. 25 ; N 3. 1893.

l'homme, le fait si frappant que la maladie a été provoquée par un vibrion ancien, presque dépourvu de toute virulence pour les animaux, chez une personne non sujette à des indigestions, a suggéré l'idée de quelque influence favorable toute particulière. Après avoir constaté que, parmi les microbes favorisant en cultures le vibrion cholérique, une des premières places est occupée par des sarcines, j'ai consulté mon livre d'expériences, et j'y ai trouvé l'indication que dans les cultures des premiers vomissements de mon malade, les colonies étaient surtout constituées par une sarcine jaune. Des expériences ultérieures ont démontré l'influence favorable de la sarcine dans le choléra intestinal des jeunes rongeurs.

Dans l'autre exemple que j'ai rapporté de choléra expérimental chez l'homme, c'était encore une culture des moins virulentes, déjà âgée de 11 jours, absorbée par une personne chez laquelle on ne pouvait supposer aucune sensibilité particulière, qui a provoqué la maladie classique.

On a donc le droit de penser, à titre d'hypothèse, que la sensibilité et la réceptivité de l'homme pour le choléra, sont en grande partie influencées par les microbes des voies digestives, favorisant ou empêchant l'action pathogène du vibrion spécifique. Cette supposition s'accorde beaucoup mieux avec les faits que l'hypothèse d'une influence intime du tissu de la paroi intestinale, qui permettrait ou empêcherait l'action des toxines cholériques.

Dans le cas de choléra intestinal des jeunes rongeurs, qui est une des bases de la théorie que j'expose, on pourrait attribuer à leur jeune âge la sensibilité pour le vibrion cholérique. On sait que beaucoup de microbes sont plus pathogènes pour les jeunes animaux que pour les adultes. Peut-être ce facteur joue-t-il aussi un rôle, mais le fait que les cobayes plus jeunes que les lapins résistent beaucoup mieux au choléra, s'expliquerait plus facilement par l'intervention de la flore microbienne, plus riche chez les jeunes cobayes que chez les jeunes lapins.

La théorie que je cherche à soutenir implique une certaine localisation de la flore microbienne. Autrefois on l'admettait pour le vibrion cholérique lui-même, qu'on supposait être une plante exotique, peu capable de vivre dans nos climats. Des faits nombreux ont démontré qu'une pareille hypothèse est

insoutenable. Le vibrion cholérique s'adapte bien à des conditions d'existence très différentes de celles du delta du Gange, et peut vivre longtemps dans nos latitudes.

La flore de l'estomac humain est très peu connue ; celle de l'intestin grêle de l'homme l'est encore moins. Il est évident qu'une étude suivie de cette flore est nécessaire pour se faire une idée précise sur les conditions que trouve le vibrion cholérique, parvenu dans les voies digestives. Mais le petit nombre de faits, recueillis dans la science, présente déjà un grand intérêt. M. W. de Bary [1], qui a étudié la flore stomacale de 17 personnes de Strasbourg, a fourni des documents qui prouvent que cette flore est loin d'être monotone. Sur ces 17 cas, la sarcine n'a été retrouvée que dans 3 (18 0/0). Les torulas (formes-levures, ne faisant pas fermenter les sucres) étaient beaucoup plus fréquentes, à peu près dans 76 0/0 des cas. Si, d'une façon absolument problématique, on admettait que, pour que le vibrion cholérique provoque le choléra chez l'homme, il faut qu'il soit favorisé par les torulas et les sarcines réunies, des 17 personnes de M. W. de Bary, trois seulement devraient être signalées comme sensibles au choléra.

M. Abelous [2] a étudié à Montpellier la flore de son propre estomac, d'une façon systématique et pendant une longue période. Il signale la présence de 16 formes microbiennes, parmi lesquelles les sarcines (bactéries favorable au vibrion cholérique) et le bacille pyocyanique (bactérie qui lui est plutôt défavorable). Mais il ne mentionne pas les torulas. Par contre MM. Capitan et Morau [3], n'ont jamais trouvé, chez trente personnes, étudiées sous ce rapport, ni la sarcine ni le bacille pyocyanique. Ils ont le plus souvent obtenu des torulas, dont ils ont isolé deux espèces. Le troisième microbe, retrouvé par eux, était un petit bacille liquéfiant la gélatine et donnant des colonies jaunes.

Dans son mémoire sur les sarcines de l'estomac, qui vient de paraître, M. Oppler [4] signale ce fait intéressant que la *sarcina ventriculi* se trouve régulièrement chez des individus atteints de la dilatation bénigne de l'estomac, tandis que dans une série d'autres maladies (gastrite aiguë et chronique, atonie, ulcère

1. *Archiv. f. exper. Pathol.*, V. XX, 1886, p. 243.
2. Recherches sur les microbes de l'estomac, 1889.
3. *C. r. de la Soc. de Biologie*, 1889, p. 25.
4. *Münchener med. Wochenschr.*, 1894, n° 29, p. 570.

rond, etc.), elle ne se rencontre que d'une façon accidentelle. Par contre, dans les dilatations de l'estomac dues au cancer, la *sarcina ventriculi* présente une grande rareté. M. Oppler a isolé de l'estomac cinq espèces de sarcines, dont une, la sarcine jaune orangée, la plus rare de toutes, se distingue par la facilité avec laquelle elle pousse dans des milieux acides. On comprend facilement quelle importance peuvent acquérir tous ces faits pour la question de l'étiologie du choléra.

Dans le matériel stomacal que j'ai étudié, sur dix cas, je n'ai rencontré qu'une seule fois la sarcine en quantité abondante; c'était cette sarcine blanche et visqueuse qui a servi dans mes expériences sur le choléra intestinal des rongeurs. Les torulas étaient plus fréquentes, et j'en ai isolé plusieurs variétés.

En dehors de ces faits, qui démontrent la localisation des microbes de la flore humaine, je pourrais en signaler plusieurs autres. On connaît bien le caractère local des épidémies de la fièvre récurrente. Le spirille d'Obermeyer est une bactérie parasite, très fréquente dans certains pays et absolument inconnue dans d'autres (la France par exemple). On a recueilli d'un autre côté un certain nombre de faits sur la localisation individuelle du pneumocoque. Tandis que la cavité buccale de certaines personnes en renferme des quantités, quelquefois pendant des années, chez d'autres individus ce microbe fait complètement défaut. Dans ses recherches sur le pus bleu, M. Mühsam [1] a constaté que le bacille pyocyanique se trouve comme saprophyte sur la peau de la moitié des individus. On pourrait augmenter le nombre d'exemples analogues.

Les fermentations fournissent d'autres preuves en faveur d'une certaine localisation de la flore microbienne. M. Duclaux m'a communiqué ce fait que certains fromages, comme par exemple les fromages de Brie, préparés d'après le même procédé, mais dans d'autres localités que la Brie, y réussissent moins bien, même quand on s'est servi, comme semence, des cajets de paille provenant de la Brie et renfermant les microbes de cette région. Ces microbes, mis en contact avec la flore du nouvel endroit, étaient envahis par des représentants de cette flore nouvelle. D'un autre côté, dans certaines localités, comme par exemple en Champagne, d'après M. Duclaux, le jus de raisin est envahi dans la grande

1. Cité dans le *Centralb. f. Bakter.*, 1894, p. 316.

majorité des cas par la même espèce de levure. On sait l'application qu'on tente de faire avec des levures de certaine provenance locale pour l'amélioration des vins.

En se plaçant à ce point de vue que dans le choléra, maladie due à l'action spécifique du vibrion de Koch, les microbes favorisants et empêchants des organes digestifs jouent un rôle des plus importants, on pourra expliquer des faits d'épidémiologie qui semblaient être en désaccord avec la théorie du bacille-virgule, et surtout l'influence du temps et des lieux, incontestable dans le développement des épidémies.

X

CONCLUSIONS.

1. L'immunité locale, ce fait solidement établi dans l'épidémiologie du choléra, ne peut être expliquée par des conditions particulières, empêchant la vie du vibrion spécifique. Ce microbe peut se trouver en dehors de l'épidémie cholérique et dans des endroits parfaitement indemnes.

2. Il n'est pas possible d'admettre que l'immunité locale tienne à l'état de vaccination inconsciente et permanente des habitants.

3. Le sang des habitants des localités indemnes ne se distingue par aucune propriété particulière préventive vis-à-vis de l'infection cholérique.

4. L'ingestion de cultures cholériques ne protège pas sûrement contre l'effet pathogène du vibrion de Koch.

5. Le vibrion cholérique développé sur des milieux nutritifs avec d'autres microbes, subit une grande influence de la part de ces derniers.

6. L'immunité des animaux contre le choléra intestinal est en grande partie due à l'influence empêchante de la flore du canal digestif sur le vibrion cholérique.

7. Tant que les jeunes lapins ne se nourrissent que de lait de leur mère, ils manifestent une grande sensibilité pour le vibrion cholérique. Il se développe chez eux un choléra intestinal, analogue à celui de l'homme. Ce choléra est facilité par l'action de certains microbes.

8. Les jeunes cobayes sont moins sensibles à l'ingestion du vibrion cholérique que les jeunes lapins. Aussi le choléra

intestinal des jeunes cobayes est beaucoup moins typique que celui des jeunes lapins.

9. La vaccination des jeunes lapins par les cultures stérilisées ou vivantes du vibrion cholérique ne les protège pas contre le choléra intestinal.

10. La protection des jeunes lapins contre le choléra intestinal par le sérum des animaux vaccinés contre la péritonite cholérique, est quelquefois efficace. Mais cette action est trop inconstante pour qu'on puisse se fier à elle. Le sérum du cheval normal ne peut pas être sûrement utilisé pour protéger les jeunes lapins contre le choléra intestinal.

11. Les tentatives pour empêcher le choléra à l'aide des microbes, ont démontré qu'il existe des bactéries, dont la présence dans les voie digestives gêne l'action pathogène des vibrions. Ces expériences, non achevées, n'ont pas abouti jusqu'à présent à un résultat définitif.

12. Dans l'immunité et la réceptivité de l'homme et des animaux vis-à-vis du choléra intestinal, la flore microbienne du canal digestif joue un rôle important. S'appuyant sur ce fait, on peut facilement concilier la vérité fondamentale que le vibrion de Koch est l'agent spécifique du choléra, avec les données de l'épidémiologie, notamment avec l'influence des lieux et du temps sur la marche des épidémies cholériques.

Explication des figures de la planche XI.

Fig. 1. Coupe de l'intestin grêle d'un lapin mort du choléra intestinal en 36 heures.

Fig. 2. Une partie d'une autre coupe du même organe pour montrer les détails.

Fig. 3. Une partie de l'intestin grêle d'un lapin, qui a ingéré le vibrion de Massaouah avec les microbes favorisants, et qui a été sacrifié 16 heures après le début de l'expérience.

UN CAS DE CHOLÉRA VRAI A BACILLE-VIRGULE

DANS LA BANLIEUE PARISIENNE (SAINT-DENIS)

En juillet 1893,

PAR LE Dr NETTER,

Professeur agrégé, médecin des hôpitaux.

(Travail du Laboratoire d'hygiène de la Faculté de Médecine.

L'épidémie cholérique de 1892 *a pris fin avec cette année à Paris et dans la banlieue*[1]. Les documents de la préfecture de police signalent une atténuation considérable dès le 1er novembre. A partir de ce moment il ne se produisait plus que des cas isolés, et l'épidémie était considérée comme terminée.

Le 28 novembre nous prenions la direction du Service d'isolement au bastion XXXVI, et ce service, destiné non seulement aux cholériques de la capitale, mais encore à ceux de la banlieue, recevait seulement 13 malades dont les selles contenaient le bacille-virgule. Le dernier de ces malades est entré le 14 décembre, et, bien que le service ait été fermé seulement le 20 janvier, il n'y eut aucune admission ultérieure de cholérique.

Pendant l'été de 1893, quelques malades atteints d'accidents cholériformes étaient admis à l'hôpital Necker. Dans aucun de ces cas M. Metchnikoff n'a trouvé de bacille-virgule.

L'épidémie cholérique de 1892 n'a pas eu de retour offensif. Elle a suivi la marche classique du choléra à Paris. A *l'encontre de beaucoup de localités, Paris n'a presque jamais été visité par une épidémie deux ans de suite.*

Le choléra de 1865 a seul fait une sérieuse exception à cette règle, car la reprise du choléra en 1833 après l'épidémie de 1832 a été relativement insignifiante, et les quelques cas observés en 1853 avant l'épidémie de 1854 n'ont fait leur première apparition que le 7 novembre, et ne sauraient constituer d'épidémie distincte.

1. L'épidémie cholérique de 1892 dans le département de la Seine, Paris, 1893.

Voici du reste un tableau qui donne en A le chiffre total des décès, et en B le nombre de morts pour 100,000 habitants aux diverses apparitions du choléra.

		A	B
1832	26 mars au 30 septembre..........	18402	2342
1833	janvier à décembre................	505	64
1849	9 mars au 31 octobre..............	19615	1861
1853-54	7 novembre à fin décembre........	9096	774
1865	1er septembre 1865, fin décembre...	6347	354
1866	juillet à décembre................	5218	289
1873	29 août au 30 novembre...........	855	46
1884	3 novembre au 31 décembre........	986	44
1892	mai à décembre[1].................	894	36

Mais si Paris et sa banlieue n'ont pas eu d'épidémie en 1893, *il ne s'ensuit pas qu'il n'ait pu y avoir cette année de cas isolé de choléra.*

Nous avons été à même d'en étudier un dans lequel nous avons pu isoler le bacille-virgule : *cas de choléra à la fois sporadique puisqu'il a été isolé, asiatique puisque les selles renfermaient le vibrion du choléra indien.*

Cette constatation a un intérêt assez considérable au point de vue scientifique, et voici pourquoi. MM. Blachstein, Sanarelli et Metchnikoff ont montré que *l'eau de Seine en* 1893 *a renfermé, du mois d'avril au mois d'août, des vibrions dont quelques-uns avaient tous les caractères du vibrion cholérique.*

Pareille constatation n'avait encore été faite que dans des localités où existaient des cas de choléra. Les vibrions de Sanarelli faisaient exception si, comme il était autorisé à le dire, « pendant tout l'été de cette année Paris et sa banlieue ont été absolument exempts de choléra[2]. »

Le fait que nous allons rapporter prouve que cette proposition n'est pas tout à fait exacte, et que les constatations de Sanarelli peuvent être rapprochées de celles des autres auteurs qui ont trouvé le vibrion cholérique dans les eaux, et particulièrement de Dunbar[3].

Voici dans quelles conditions ont été faites nos recherches. Notre excellent confrère le Dr Dupuy, chargé du service d'isolement de l'hôpital de Saint-Denis, a bien voulu nous confier

1. Jusqu'en 1884 et inclusivement, nous avons pris les chiffres du rapport de M. Bertillon qui diffèrent un peu de ceux du mémoire de la préfecture de police.

2. *Annales de l'Institut Pasteur*, octobre 1893.

3. Versuche zur Nachweiss von Choleravibrionen in Flusswasser. *Arb. a. d. k. Gesundh.*

l'examen bactériologique des selles de ses malades, en 1893 comme en 1892.

Pendant cette dernière année, le nombre des cholériques à Saint-Denis a été très considérable, et nous n'avons pas examiné moins de 91 cas, sur lesquels nous avons constaté 73 fois le bacille-virgule, qui a été isolé 66 fois sur les plaques de gélatine [1].

En 1893, du 19 juin au 7 juillet, 11 malades ont été envoyés dans le service d'isolement. Tous ont guéri : un de ces malades avait dans ses selles le bacille-virgule.

Il convient de remarquer que certainement en 1893 le bacille-virgule n'a pas été moins bien cherché qu'en 1892. On pourrait plutôt soutenir le contraire, car en 1892 je n'avais recours le plus souvent qu'aux plaques de gélatine, et je n'ai utilisé parallèlement la méthode de Schottelius que dans un quart des cas.

En 1893, au contraire, j'ai toujours, en même temps que les plaques de gélatine, employé la méthode d'enrichissement par culture à 37° dans une solution de peptone et de sel à 1 0/0.

Je suis donc en droit de dire que *le bacille-virgule en* 1893 *à Saint-Denis a été extrêmement rare, et il est fort probable que mon observation est unique*.

Ce bacille-virgule a été retiré des selles du nommé Guilloux, soumises à mon examen le 7 juillet, et je n'insisterai pas outre mesure sur sa description, *puisque le vibrion présentait toutes les conditions requises par Koch* : forme incurvée, mobilité, aspect brillant, granuleux, bords un peu irréguliers des colonies, liquéfaction absolument classique de la gélatine, réaction indol-nitreuse après 24 heures, beau voile à la surface des cultures dans l'eau peptonisée, développement classique sur la gélose, la pomme de terre, le sérum gélatinisé. L'inoculation intrapéritonéale de petites quantités d'une culture fraîche amenait la mort du cobaye avec les symptômes et les lésions classiques.

Comme le plus grand nombre des vibrions isolés par nous en 1892, non seulement à Saint-Denis, mais dans le reste de la banlieue, à Paris et dans divers points de la France, le vibrion est fortement incurvé, gros et court, et muni d'un seul cil. Il coagule le lait au bout de 2 à 3 jours [2].

1. Voir les documents insérés à la fin de ce travail.

2. NETTER, Rech. bactér. sur les cas de choléra ou de diarrhée cholériforme observés dans la banlieue de Paris : *Soc. méd. des hôpitaux,* 15 juillet 1892.

Seule son action sur le pigeon ne répond pas absolument à la description classique. Cet animal succombait à une inoculation intra-musculaire. Mais pareille action pathogène pour le pigeon n'est pas incompatible avec le vibrion cholérique. Elle a été signalée par divers auteurs, et elle existait chez quelques vibrions isolés par nous en 1892.

Nous avons résumé aussi brièvement que possible les observations des onze malades qui ont fait l'objet de nos recherches en 1893. L'histoire de ces malades a été rédigée plus complètement par M. Siou interne de M. le D. Dupuy, mais les proportions de cet article ne permettent pas de la reproduire intégralement.

CHOLÉRA VRAI, AVEC BACILLES-VIRGULES DANS LES SELLES.

I.—Guilloux, Joseph, 44 ans, terrassier à Saint-Denis depuis le 30 juin, entre à l'hôpital le 7 juillet. A travaillé le 4 juillet au canal de Saint-Denis, où il a bu beaucoup d'eau. Diarrhée abondante le 5, qui le 6 augmente et s'accompagne de crampes, puis de vomissements.

Tableau classique du choléra : facies, refroidissement, aphonie, douleur épigastrique, crampes, diarrhée, vomissements, anurie, pouls petit. Les jours suivants cyanose. État grave pendant 9 jours. Apparition le 17 juillet de fièvre allant jusqu'à 40° (18 juillet), de délire, d'éruption papuleuse (choléra typhoïde). Parotidite qui ne suppure pas. La diarrhée n'a pris fin que le 31 juillet. Exeat le 17 août.

Examen des selles le 7 juillet. Sur les lamelles, nombre assez grand de bacilles incurvés ayant l'apparence de bacilles-virgules. Isolement facile sur plaque de gélatine. Développement très marqué d'un voile assez cohérent, blanc grisâtre, sans rides, à la surface de l'eau peptonée à 37°.

DIARRHÉES CHOLÉRIFORMES DANS LESQUELLES ON NE TROUVE PAS DE VIBRIONS CHOLÉRIQUES.

II. — Flint, Joseph, 52 ans, journalier, entre le 19 juin : a bu beaucoup d'eau, mais de l'eau du puits artésien ou de la pompe de l'usine. Début le 16 juin par diarrhée, — vomissements le 19, facies grippé, langue refroidie, crampes, selles riziformes, diminution de l'élasticité de la peau, affaiblissement de la voix, diminution de l'urine. Amélioration très marquée dès le lendemain, selles bilieuses plus nombreuses, — peut être considéré comme guéri le 22, sort le 29 juin.

Les selles envoyées le 19 juin ont bien l'aspect riziforme.

Le microscope ne montre pas de formes incurvées. Les cultures ne font pas voir de bacilles-virgules. Sur les plaques de gélatine, colonies de bacterium coli et bâtonnets liquéfiants.

III. — Bailly, 22 ans, mégissier, entre le 23 juin ; habite une maison insalubre dans une cité où ont été signalés, en 1892, 3 cas de choléra, et travaille dans une usine sur le bord de la Seine, où il y a eu quelques cas de choléra en 1892.

Excès de boisson le 16 et le 17. Dans la nuit du 22 au 23, diarrhée, vomissements, crampes.

Le 23, face grippée, soif vive, douleurs abdominales, évacuations bilieuses. Température 38°4 et 38°7. Amélioration dès le lendemain. La diarrhée a pris fin le 25 : sort guéri le 1er juillet.

Les selles envoyées le 24 juin sont incolores, fétides, l'examen microscopique ne montre ni microbes incurvés ni spirilles. Pas de colonies de bacille-virgule.

IV. — Lebon, 27 ans, terrassier, entre le 25 juin : boit beaucoup d'eau d'une fontaine entre Pierrefitte et Gonesse [1]. Pris le 25, à 5 heures du matin, de coliques, borborygmes, crampes : extrémités légèrement cyanosées, pas de refroidissement, légère douleur abdominale. Amélioration très marquée dans la nuit. Pas de selles les 27 et 28. Sort guéri le 9 juillet. Selles envoyées le 25. — Liquide peu coloré avec nombreux flocons transparents. Pas de bacilles-virgules à l'examen microscopique ni aux cultures.

V. — Baron, Jules, blanchisseur, entre le 26 juin : mal à l'aise depuis une quinzaine de jours. — Début de la diarrhée le 20 juin. Vomissements le 22, crampes le 24, diminution de l'urine. Voix un peu cassée. Amélioration dès le lendemain. — Exeat le 5 juillet,

Selles examinées le 27 juin. Apparence bilieuse. Examen microscopique et culture démontrent l'absence de bacille-virgule.

VI. — Provost, Joseph, mégissier, 19 ans, entre le 1er juillet. Est employé dans la même usine que le n° III ; diarrhée le 23 et le 24 juin. Vomissements le 30, crampes le 1er juillet. Température élevée, 40°7, douleur épigastrique. Amélioration très marquée le 3, considéré comme guéri le 5. Exeat le 8 juillet. Pas de bacille-virgule dans les selles.

VII. — Gibergue, tailleur de pierres, 46 ans, entre le 27 juin. Il y a eu l'an dernier un cas de choléra dans la maison. Début le 25 par de la diarrhée : le 27, crampes, vomissements, aphonie, oligurie. Amélioration le 28. Sort le 5. Pas de bacilles-virgules dans les selles examinées le 1er juillet.

VIII. — Femme Frémont, entre le 5 juillet. Boit beaucoup d'eau d'un puits suspect. Un enfant de son patron a eu de la diarrhée et des vomissements. Début du 1er au 2 juillet, malaise, vomissements et crampes. Du 2 au 3 diarrhée très fréquente, facies grippé. Guérie le 9.

Selle examinée le 5. Liquide jaune clair, dépôt pulvérulent coloré en noir par le bismuth. Culture pure de bacterium coli.

Nouvel examen le 9. Mêmes résultats.

IX. — Rémond, charretier, 26 ans, entre le 6 juillet. Début le 5, diarrhée, vomissements, crampes. A l'entrée, facies grippé, anurie, voix très cassée,

1. Il y a eu plusieurs cas de choléra à Gonesse en 1892. V. Proust, Netter et Thoinot. Le choléra dans le département de Seine-et-Oise en 1892. *Revue d'hygiène*, juillet 1893.

gargouillement abdominal, pas de refroidissement. Amélioration du 6 au 7. Sort le 9 juillet.

Selle liquide jaune examinée le 6 juillet. Dépôt pulvérulent blanc, pas de bacille-virgule.

X. — Laurent, 17 ans, admise au pavillon d'isolement le 6 juillet, diarrhée, vomissements. Le 8 juillet on rectifie le diagnostic. Il s'agit d'une fièvre typhoïde.

Selle jaune avec dépôt pulvérulent, pas de vibrions.

XI. — Devienne, Gabrielle, 7 ans, entrée le 7 juillet. Il y a huit jours, le grand-père, venu de l'Ile Saint-Denis, où il y a eu des cas de cholérine, a eu la cholérine dans la maison de sa petite-fille. Début le 7 juillet au matin, diarrhée, vomissements, crampes, yeux très excavés, diminution de la tonicité de la peau. Pas de refroidissement. Ventre empâté, gargouillements. Bonne journée le 9. Sort guérie le 15 juillet.

Les selles examinées le 19 sont liquides, jaunes, avec dépôt pulvérulent. Elles ne contiennent pas de bacilles-virgules.

On voit que chez ces malades le tableau clinique était celui du choléra ou de la cholérine. Dans presque toutes les observations, il s'agit d'individus ayant bu beaucoup d'eau et principalement d'eau de Seine. Plusieurs fois il existe des détails étiologiques qui semblent établir des présomptions sérieuses en faveur du choléra vrai.

Les malades III et VI étaient occupés dans la même usine. Il y a eu coexistence de cas de diarrhée avec vomissements dans la même maison pour les observations VIII et XI.

On a noté, en 1892, des cas de choléra dans la maison ou dans la cité habitées par les malades III et VII. On est tenté d'invoquer une importation de la maladie pour le XI.

On pourrait supposer que dans quelques-uns de ces cas le bacille-virgule a pu être présent et échapper à nos recherches. Nous reconnaissons que la chose est d'autant plus possible que, sauf chez un seul malade, les selles n'ont été examinées qu'une fois. Nous rappellerons cependant qu'en 1892, alors que notre technique était certainement moins précise, les résultats de nos examens ont été bien différents, et qu'à cette époque, comme en 1893, nous ne faisions que pour un jour seulement l'examen des selles des malades.

Au surplus cette objection n'enlèverait rien à la démonstration que nous voulions fournir, à savoir qu'il y a eu en 1893 dans la banlieue parisienne un cas de choléra avec bacilles-virgules.

CONCLUSIONS.

1. Nous avons fait, en juillet 1893, l'examen bactériologique des selles d'un sujet atteint de choléra. Cet homme n'avait pas quitté la banlieue de Paris et buvait de l'eau de Seine qui, à ce moment, renfermait des bacilles-virgules, comme l'ont démontré Blachstein et Sanarelli.

2. Le rapprochement de ces deux faits témoigne en faveur d'une relation entre l'existence du choléra et la présence de bacilles-virgules dans l'eau.

3. S'il y a eu un cas de choléra dans la banlieue parisienne en 1893, il n'y a pas eu d'épidémie cholérique dans tout le bassin de la Seine, bien que quantité de personnes aient bu cette eau contaminée. La présence de bacilles-virgules dans l'eau ingérée ne suffit donc pas à provoquer l'apparition d'une épidémie.

4. Le cas de choléra observé à Saint-Denis en 1893, démontre la persistance de la vie et de la virulence des bacilles-virgules introduits dans la Seine en 1892. Le bacille reste donc actif dans l'eau plus d'un an après sa sortie du corps. Des examens nombreux et répétés de l'eau et des selles de sujets malades permettront sans doute d'établir combien peut durer cette vitalité. Grâce à ces examens on pourra se prononcer sur la question si controversée de la reviviscence du choléra en Europe à longues échéances, reviviscence qui ne semblerait pas très probable, si l'on tient compte des enseignements fournis par les anciennes épidémies.

POST-SCRIPTUM.

Au moment où nous corrigeons ces épreuves (30 juillet 1894), nous venons d'avoir la preuve que l'eau de Seine dans la banlieue parisienne recèle encore des bacilles-virgules susceptibles de donner naissance au choléra.

Nous avons en effet constaté le bacille-virgule dans les déjections d'un malade de Saint-Denis, qui nous ont été envoyées le 24 juillet par M. le Dr Dupuy. Nous avons retrouvé des bacilles-virgules dans des échantillons d'eau qui nous ont été envoyés le 27 juillet : eau du puits que buvait ce malade, eau du Croult, ruisseau qui servait à son industrie de blanchisseur, eau de

Seine, eau du canal de Saint-Denis. On ne trouve pas de vibrions dans les eaux d'Oise et de puits artésien qui sont fournies aux parties périphérique et centrale de Saint-Denis.

Ces recherches ont besoin d'être poursuivies et complétées, ce que nous comptons faire avec le concours de M. Mosny. Nous nous réservons de les exposer d'une façon plus détaillée. Il nous a paru impossible de passer sous silence les points déjà acquis.

Depuis le commencement de 1894 et avant le cas du 24 juillet, nous avions examiné 4 fois des déjections de sujets signalés comme cholériques à Paris (14 février, 31 mai, 9 juillet). Dans aucun de ces cas nous n'avions trouvé de bacilles-virgules.

EXAMENS BACTÉRIOLOGIQUES DES SELLES ENVOYÉES DE SAINT-DENIS EN 1892 [1].

A. — Chez 66 malades les bacilles-virgules ont été isolés par la culture.

1	cas le	1er	juin	Peletier.
1	—	8	—	Spinglar.
2	—	13	—	Madelena, Levillat.
1	—	1er	juillet	Bastard.
2	—	2	—	Zirwes, Allard.
3	—	11	—	Joan, Guaydon, Blain.
1	—	13	—	Blé.
8	—	15	—	Martin, Videlo, Dehault, Bombarde, Gueguen, femme Guéguen, femme Brumagne, Demesse.
7	—	18	—	Martellier, femme Féderi, fils Brumagne, Le Couvrard, Chauve, Colmar, Martin.
9	—	20	—	Clarot, Payen, enfant Labbé, enfant Joan, enfant Martin, Saint, femme Autier, femme Le Calvez, Labbé père.
1	—	23	—	Callot.
3	—	24	—	Courtois, Combet, Rovera.
2	—	27	—	Robin, Scheffer.
2	—	29	—	Bulte, mari et femme.
2	—	31	—	Epoux Martin.
1	—	2	août	Legoff.
3	—	4	—	Femme Fourier, Mackereel, Stier.
2	—	8	—	Femme Lemorvan, Bayen.
1	—	9	—	Olten.
3	—	11	—	Caquelin, Pitou, Hermans.
1	—	13	—	Vinkler.

1. L'histoire de ces malades est résumée dans l'intéressant mémoire de M. le Dr Dupuy : Contribution à l'étude étiologique du choléra de 1892 dans la banlieue parisienne. Paris 1894.

2	cas le	22	août	Chevalier, Sabatier.
8	—	31	—	Chevance, Balché, Franehl, Senécal, Jacquemiss, Fervaille, Wilmouth, Gorlet.

Chez deux de ces sujets le bacille-virgule ne répondait pas tout à fait au type habituel en 1892. Chez la femme Allard (2 juillet) le bacille était plus long, plus ou moins infléchi, il liquéfiait plus lentement la gélatine, il ressemblait davantage au type mince, classique de Calcutta conservé dans le laboratoire. Chez Chauve (18 juillet) le bacille virgule liquéfiait très peu la gélatine.

B. — Chez 7 malades, les bacilles-virgules, très nets sur les préparations, n'ont pas été cultivés.

2	cas le	11	juillet	Jonot, Griswar.
1	—	18	—	Pauchet.
1	—	27	—	Femme Bouraget.
2	—	13	août	Courson, Valette.
1	—	22	—	Robert.

Dans 3 de ces cas l'addition d'acide sulfurique pur aux selles faisait apparaître une belle couleur rouge.

C. — Dans 18 cas l'examen microscopique et les cultures n'ont pas montré de bacilles-virgules.

1	cas le	1er	juin	Femme Hervé.
1	—	17	—	Enfant Suzaune.
1	—	6	juillet	Feriot.
1	—	11	—	Gestin.
1	—	15	—	Garnier.
2	—	20	—	Linteperg, Hubert.
2	—	25	—	Femme Lemorvan, Salloudre.
1	—	27	—	Steiner.
1	—	13	août	Femme Martellier.
1	—	20	—	Platel.
6	—	1er	septembre	Femme Testu, Louvel, Joseph Claudin, Lessel, Lequez.

Dans les 2 premiers cas l'autopsie a montré qu'il ne s'agissait pas de choléra.

Chez la femme Lemorvan (25 juillet) on a trouvé ultérieurement des bacilles-virgules (8 août). Nous ne pouvons dire s'il y a eu infection hospitalière, bien que l'observation porte à le croire (Mém. de M. Dupuy. Obs. LXXIX, p. 63). La plupart des malades de cette catégorie ont guéri rapidement.

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE LA DIPHTÉRIE AVIAIRE EN TUNISIE

PAR

Dr A. LOIR,
Directeur de l'Institut bactériologique
de la Régence de Tunis.

E. DUCLOUX,
Vétérinaire militaire au dépôt de remonte
de Tunis.

Au moment de l'occupation française en 1882, les Arabes Tunisiens élevaient leurs volailles avec l'indifférence qu'ils apportent à toute chose, et laissaient à leurs animaux une liberté complète, autour de leur habitation ou de leur tente. Depuis notre arrivée dans le pays, de nombreux colons ont voulu s'occuper de l'élevage des volailles; les uns, suivant la mode arabe, les laissent libres dans les environs de la ferme, mais cherchent à améliorer les races indigènes; les autres aménagent de véritables volières et se rapprochent plus de nos procédés d'élevage européen.

Dans les deux cas, après une courte période de succès, la basse-cour se dépeuplant, la majeure partie des colons durent abandonner l'élevage des volailles. Actuellement, il semble que la cause de dépeuplement augmente d'année en année : les Arabes ne produisent presque plus de volailles, quoique les races indigènes, plus rustiques, soient moins sensibles à l'épidémie. Ils perdent, lorsque la mortalité se met chez eux, la moitié, les deux tiers de l'effectif de leur basse-cour. Les colons qui ont essayé d'élever des races perfectionnées en faisant venir à grands frais des bêtes de France, voient certaines années tout disparaître. Aussi l'élevage de la volaille sur une grande échelle est-il abandonné dans la Régence.

Il en résulte que ce qui se vendait 25 et 30 centimes il y a dix ans, vaut maintenant jusqu'à 2 francs. La Tunisie produit à peine pour sa consommation, et ne fournit rien sur les 14 millions de kilogrammes d'œufs qui entrent chaque année à Marseille, venant d'Italie, de Turquie, d'Égypte, de la Tripolitaine, du Maroc, etc...

Trouver un remède qui permettrait d'avoir des basses-cours dans chaque ferme, serait donc un véritable service à rendre à la Tunisie, non seulement au point de vue de l'augmentation des ressources alimentaires du pays, mais au point de vue aussi du commerce d'exportation de la colonie.

Causes de la mortalité. — Cette mortalité exagérée est due à une maladie qui sévit constamment en Tunisie, mais qui, à certaines époques de l'année, en automne par exemple, fait des ravages encore plus considérables.

Dès l'installation du laboratoire de bactériologie de la Régence, pendant les derniers mois de l'année 1893, notre attention a été appelée sur cette affection.

Nous savons aujourd'hui que cette maladie n'est autre que la diphtérie des volailles; nous avons fait l'étude de son microbe ; frappés de la fréquence des cas d'angines à fausses membranes chez des hommes placés dans les milieux où il y avait une épizootie sur les poules, nous avons fait l'étude bactériologique de plusieurs cas de ces angines et avons trouvé : une fois le bacille classique de Klebs-Lœffler, d'autres fois, des bacilles pseudo-diphtéritiques, des streptocoques, et enfin, une fois, une culture pure du bacille de la diphtérie aviaire chez un enfant de 7 ans, vivant dans une ferme infectée, où les poules venaient d'être décimées par la maladie. Enfin, poursuivant l'étude de notre microbe, nous sommes arrivés à l'atténuer par l'action de la chaleur, et nous avons pu inoculer dans la pratique un certain nombre de poules, qui, placées dans des milieux où règne la maladie, résistent parfaitement.

Tous les animaux de basse-cour paient leur tribut à la maladie; il nous est venu des poules, des canards, des moineaux, des pigeons et des dindons, atteints de cette affection, de toutes les parties de la Régence de Tunis.

Tous ces animaux, sans distinction d'âge, se montrent sensibles à l'inoculation des matières virulentes, ou de cultures du microbe dont nous parlerons tout à l'heure.

Ce microbe est inoculable aux lapins, qui succombent en quelques jours si la dose est suffisante, qu'ils soient inoculés sous la peau, dans les veines, dans la trachée, dans le tube digestif, dans le péritoine; pourtant l'inoculation intra-veineuse est la méthode de choix. Nous n'avons jamais pu tuer ni le

cobaye, ni les animaux de l'espèce bovine, même à la suite d'injections intra-veineuses à doses massives.

La maladie se présente sous deux formes, l'une très grave, dans laquelle la mort arrive rapidement, tandis que chez d'autres animaux elle évolue plus lentement, et dure plusieurs jours.

Ces différences dans la durée d'incubation et la gravité de la maladie se présentent dans une même basse-cour, dans la même épizootie, et dans tous ces cas nous avons trouvé le même microbe, ce qui prouve bien que nous avions affaire à la même affection.

Au début de nos recherches, la maladie était appelée tantôt diphtérie, tantôt choléra des poules, tantôt variole. Dans tous les cas examinés dans les diverses parties de la Tunisie, nous avons toujours trouvé la même affection, si bien que nous en sommes à douter, après huit mois de recherches, de l'existence du choléra des poules dans la Régence, où nous n'avons jamais pu le rencontrer.

A côté de la diphtérie, et concurremment avec elle, nous avons quelquefois vu, chez les poules atteintes de la soi-disant variole, des pustules boutonneuses que nous n'avons jamais pu reproduire chez nos animaux d'expériences, pustules que l'on rencontre quelquefois chez des bêtes en apparence bien portantes. Nous pensons que cette affection n'a rien à voir avec la mortalité actuelle, et nous étudierons cette maladie dans un autre travail.

Nos recherches eurent pour point de départ une épidémie de soi-disant choléra des poules que l'un de nous fut chargé par la direction de l'Agriculture d'aller étudier à Béjà, au commencement de décembre 1893; une poule malade, rapportée au laboratoire, nous permit de commencer l'étude que nous exposons dans ce travail. Quelques jours après, deux dindes apportées au laboratoire par M. le vétérinaire en 1er Henry, présentèrent les mêmes lésions et nous donnèrent le même microbe. M. le docteur Bertholon nous remit peu après deux jeunes canards morts de la même affection que les animaux précédents; la basse-cour du commandant Catroux, contrôleur civil de Tunis, nous offrit de nouveaux sujets d'études, et depuis que nous nous occupons de cette maladie, nous recevons souvent des cadavres dans lesquels nous avons toujours retrouvé le même microbe.

Un questionnaire a été lancé dans la Régence de Tunis par une commission nommée par la section des Sciences physiques de l'Institut de Carthage pour faire une enquête au sujet de cette maladie; les réponses faites à cette commission dont nous faisions partie avec M. Henry, vétérinaire en 1[er] au 4[e] chasseurs d'Afrique, nous ont fourni beaucoup de documents intéressants sur le sujet.

Contagion. — Tous les tissus d'une bête malade sont virulents; les déjections, les sécrétions, sont également virulentes et servent de moyen de contagion. Par cohabitation directe, les poules prennent très facilement la maladie, et meurent alors même que la poule malade avec laquelle elles ont été mises en contact revient à la santé. Ainsi, une poule placée dans une cage avec la poule rapportée de Béjà, dont nous avons déjà parlé comme étant le point de départ de notre étude, prend la diphtérie et succombe au bout de 20 jours de cohabitation, tandis que la poule venant de Béjà survit. Cette expérience a été répétée une dizaine de fois en mettant des poules saines en contact avec des bêtes inoculées sous la peau, dans les veines, ou dans la trachée, et tous ces animaux sont toujours morts de diphtérie. Nous avons déjà dit que nous avions rencontré des petits oiseaux, moineaux, etc., atteints de la maladie; ils doivent en être les grands propagateurs; un autre mode de dissémination, ce sont les marchés; il nous a été donné de voir une basse-cour, indemne jusque-là, recevoir 3 poules achetées au marché : l'une de ces poules meurt de la diphtérie quelques jours après son achat; cette mort fut le début de la maladie qui décima tout le poulailler. Il fut impossible d'y reprendre l'élevage, jusqu'au jour où on eût procédé à une rigoureuse désinfection, et mis dans la basse-cour des animaux vaccinés.

Cette observation montre bien la nécessité d'avoir un petit lazaret où l'on mettra en observation pendant plusieurs jours, avant de les introduire dans la basse-cour, les bêtes que l'on vient d'acheter. Un autre mode de dissémination de la maladie qui est peu connu, semble-t-il, est l'indifférence mise à se débarrasser des cadavres, qu'on laisse sur place, ou qu'on jette sur le fumier, à la portée du reste de la basse-cour.

Symptômes, marche, lésions. — La maladie se caractérise par la formation d'un exsudat fibrineux jaune grisâtre plus ou moins

épais, qui apparaît sur les muqueuses nasales, bucco-pharyngiennes, et qui arrive à obstruer complètement les premières voies respiratoires.

Les oiseaux atteints sont tristes, abattus, ont le dos voussé, la tête et le cou rapprochés du thorax, les plumes hérissées, la respiration gênée et plus rapide ; la déglutition devient impossible, une diarrhée jaunâtre, verdâtre se manifeste toujours ; elle est plus ou moins abondante selon la gravité de l'affection. La température s'élève de plusieurs degrés, et l'appétit a complètement disparu ; par le bec entr'ouvert on voit s'échapper parfois une bave grisâtre, visqueuse, très virulente. Les muqueuses buccale et pharyngienne sont congestionnées, enflammées, et présentent en beaucoup d'endroits des boursouflures d'un rouge foncé qui se recouvrent de concrétions fibrineuses blanchâtres riches en microbes. La crête devient brunâtre et foncée, surtout lorsque l'affection se termine par la mort. Des fausses membranes plus ou moins épaisses siègent dans le poumon, les sacs aériens et l'intestin. Le foie, la rate sont congestionnés, enflammés, hypertrophiés et contiennent toujours le bacille diphtéritique en très grande quantité et à l'état de pureté. Il y a quelquefois de la néphrite. Le sang coagulé au contact de l'air, renferme l'agent virulent en moins grande abondance que le foie et la rate.

Expériences de transmission de la maladie sur la poule. — Le 20 janvier, 2 coqs reçoivent sous la peau 1 c. c. d'une culture pure faite dans le bouillon. Le 28, ces animaux ont perdu leur gaieté et leur appétit, les plumes sont hérissées, la respiration est difficile, rapide ; sur la muqueuse pharyngienne on voit de nombreux pointillés rougeâtres et un exsudat fibrineux ; il y a de la diarrhée. Tous ces symptômes augmentent en gravité jusqu'au 4 février. A partir de cette date, l'état général s'améliore, et le 12 février on constate que la muqueuse buccale s'est débarrassée presque complètement de ses fausses membranes. Le 20 février les animaux ont recouvré leur état de santé.

Le 25 janvier une poule reçoit sous la peau 3 c. c. d'une culture pure de diphtérie. Le 30, elle présente tous les symptômes généraux et locaux que nous venons d'énumérer au sujet des coqs inoculés le 20. Le 6 février nous la trouvons morte.

Autopsie : Fausses membranes très épaisses en grande quantité dans le larynx et le pharynx qui sont congestionnés, enflam-

més et recouverts de plaques hémorragiques. La rate est hypertrophiée et d'un rouge foncé. — Le foie a augmenté de volume, la muqueuse intestinale est recouverte en beaucoup d'endroits de fausses membranes. Abondance de microbes diphtériques constatée dans tous les organes, le sang, le foie, la rate, les reins, etc..... Des cultures sont faites sur gélose, sur gélatine et sur pomme de terre avec du sang, du foie et de la rate. Au bout de 48 heures, nous constatons que sur tous ces milieux il s'est développé une culture abondante, uniforme dans son aspect, dans sa couleur. L'examen de ces cultures nous montre le même bacille que nous avons vu dans le sang, le foie et la rate.

Le 4 mai, 15 poules sont inoculées sous la peau avec 1 c. c. de culture de diphtérie aviaire; 7 d'entre elles meurent les 12, 13 et 14 mai de diphtérie; les 8 autres, après avoir été malades pendant plusieurs jours, reviennent à la santé.

Le 20 avril, 3 poules reçoivent dans la trachée 5 c. c. de culture de diphtérie aviaire; elles meurent le 26 avril. Beaucoup de congestion pulmonaire, rate grosse; beaucoup de fausses membranes dans la gorge.

Le 30 mars, 2 poules reçoivent, dans la veine de l'aileron, 1 c. c. de culture, et 2 autres 2 c. c. Les premières meurent le 4 avril et les 2 dernières le 2 avril. Toujours rien au point d'inoculation, beaucoup de fausses membranes dans la gorge.

3 pigeons sont inoculés le 3 avril avec 1 c. c. dans les veines, avec une culture de diphtérie aviaire. Ils meurent au bout de 3 et 4 jours.

Microbe, virulence. — Dans tous les tissus et liquides de l'organisme d'un animal qui vient de succomber à la maladie, et pendant la maladie, dans le sang, dans les fausses membranes ou dans les mucosités filantes des voies aériennes des animaux malades, on trouve à l'état de pureté un microbe arrondi à ses extrémités, mobile. Il se cultive très bien sur la gélatine où il donne une traînée blanc-crème, peu large. Sur gélose, à la température ordinaire ou à l'étuve à 39°, la culture, moins apparente, est d'un blanc grisâtre. Sur pomme de terre il donne très rapidement, à la température ordinaire, une belle culture abondante d'un blanc jaunâtre. Dans le bouillon, de 35° à 40°, le microbe se multiplie avec une grande rapidité et trouble le liquide. Au bout de quelques jours, la partie supérieure de cette

culture s'éclaircit, tandis que dans la partie inférieure on observe un dépôt blanchâtre, visqueux, adhérent aux parois du verre. En piqûre, dans la gélatine et la gélose, il forme une traînée blanchâtre peu abondante. Il se développe également sur le blanc d'œuf stérilisé et dans l'humeur aqueuse du bœuf. Il se cultive aussi bien et aussi rapidement en présence de l'oxygène qu'à l'abri de l'air; il est donc à volonté aérobie et anaérobie. Il se colore facilement par les méthodes ordinaires, mais non par la méthode de Gram. Il meurt après avoir été soumis à la température de 60° pendant 5 minutes il résiste à la dessication.

Caractères différentiels du microbe aviaire avec le bacille de Klebs. — Il est tout à fait différent du bacille de la diphtérie humaine classique de Klebs-Lœffler. Semé sur la gélatine, la gélose, et maintenu à une température de 16-17°, il donne en 48 heures une culture; il pousse très bien sur la pomme de terre en produisant une culture abondante, épaisse et très apparente. Il tue constamment le pigeon, la poule, le lapin, à la suite de l'injection intra-veineuse ou intra-trachéale. Sous la peau, la mortalité n'est pas constante, même avec 3 c. c. de culture; mais on obtient ordinairement la mort de la moitié des bêtes inoculées.

Au point d'inoculation il n'y a jamais de réaction locale.

Atténuation, vaccination. — Les volailles qui ont résisté à une première atteinte de la maladie spontanée ou à une inoculation de matières virulentes, et après guérison complète, sont à l'abri de toutes les tentatives de contagion ou d'inoculation, même avec des doses massives du microbe virulent par voie intraveineuse. La maladie ne récidive donc pas. En possession de cette donnée, nous avons cherché à obtenir l'atténuation du microbe pour en faire un vaccin. Nous avons obtenu cette atténuation par un chauffage à 55° pendant une demi-heure. Une culture ainsi traitée et inoculée sous la peau, à la dose de 1 c. c., ne tue pas les poules, leur donne une légère élévation de température et les met dans un état d'immunité relatif, que nous complétons en inoculant comme deuxième vaccin un centimètre cube d'une culture vieille de deux mois : les animaux ont alors une immunité absolue.

Le 15 mai, sur 8 poules qui ont résisté aux différentes inoculations déjà signalées, quatre reçoivent dans les veines 2 c. c. d'une culture virulente de diphtérie, et quatre autres

reçoivent sous la peau 4 c. c. de la même culture. Cette culture est en même temps inoculée à deux témoins, un dans les veines, et l'autre sous la peau. Ces 2 témoins meurent de diphtérie en 4 et 6 jours. Une des 4 poules inoculées dans les veines meurt de diphtérie 8 jours après l'inoculation; les autres résistent.

Le 31 mai, 12 poules reçoivent sous la peau 1 c. c. de culture de diphtérie aviaire portée à 55° pendant une 1/2 heure; elles résistent. Le 11 juin, injection sous la peau de ces 12 poules, de 1 c. c. de culture virulente de deux mois; ces animaux ne présentent aucune réaction.

Le 28 juin, injection sous la peau de 6 de ces poules de 2 c. c. de culture virulente; 3 témoins sont inoculés le même jour avec la même quantité, 2 meurent 12 jours après, le 3e après avoir été très malade revient à la santé. Les 6 vaccinées résistent. Les 6 autres vaccinées sont placées dans une basse-cour infectée où elles sont encore en bonne santé.

Recherche du bacille de la diphtérie aviaire sur l'homme. — La fréquence que nous avons constatée en Tunisie, des cas d'angine diphtérique sur les hommes qui vivent en rapport avec des animaux de basse-cour infectés par la diphtérie aviaire, nous a fait rechercher si on pouvait incriminer le bacille aviaire, et s'il était possible de le retrouver dans des fausses membranes de diphtérie chez l'homme.

Nous devons, pour ces recherches, remercier M. le médecin principal Richard et M. le Dr Bertholon qui ont mis à notre disposition plusieurs de leurs malades. Nous avons ainsi pu faire l'examen bactériologique de six angines, les unes graves ayant nécessité la trachéotomie, les autres bénignes. Dans chaque cas nous prenions, par grattage avec le fil de platine, un petit fragment de fausse membrane : nous examinions au microscope et nous semions sur gélose.

A coté des microbes que l'on trouve d'ordinaire dans les fausses membranes, bacille de Klebs-Lœffler, bacille pseudo-diphtérique, streptocoque, etc., nous avons trouvé une fois à l'état de pureté un bacille en tout semblable à celui de la diphtérie aviaire, et nous nous croyons autorisés à identifier ces deux microbes. Voici le résultat de nos recherches sur ce point particulier :

1er cas. Angine bénigne dans laquelle nous trouvons un streptocoque;

2e CAS. Angine grave ayant nécessité la trachéotomie, dans les fausses membranes, nous trouvons encore un streptocoque;

3e CAS. Angine assez grave, diagnostiquée diphtérie, dans laquelle nous trouvons un bacille différent de celui de la diphtérie humaine ordinaire ainsi que de celui de la diphtérie aviaire.

4e CAS. Angine dans les fausses membranes de laquelle nous trouvons un staphylocoque.

5e CAS. Angine ayant laissé des paralysies du voile du palais et de la main : contenait le bacille classique de la diphtérie humaine.

6e CAS. Un enfant de 7 ans, habitant les environs de Tunis, dans une ferme où sévit la diphtérie aviaire depuis 6 mois, présente une angine grave à fausses membranes peu épaisses et peu adhérentes, dans lesquelles nous retrouvons, par la culture, un bacille offrant tous les caractères de celui de la diphtérie aviaire.

Ce bacille, inoculé sous la peau d'une poule, entraîne la mort de cet animal en 5 jours, et l'autopsie révèle les lésions typiques de la diphtérie aviaire, après examen microscopique et culture sur gélatine, gélose et pomme de terre.

CONCLUSIONS.

Il existe en Tunisie une maladie très répandue, à laquelle on donne souvent des noms différents, tantôt diphtérie, tantôt choléra des poules, tantôt variole, qui empêche l'élevage de la volaille sur une grande échelle. Cette maladie est la diphtérie aviaire, qui détruit les deux tiers et même la totalité des basses-cours sur lesquelles elle s'abat et n'épargne en général aucune bête de race perfectionnée.

Cette diphtérie aviaire est due à un bacille tout à fait différent de celui de la diphtérie hnmaine classique.

Ce micro-bacille se cultive facilement dans tous les milieux ; il tue poules, pigeons, dindons, canards, moineaux, lapins, etc. Les cobayes et les bovidés résistent à son inoculation.

Les poules qui, après avoir été malades à la suite de l'inoculation, reviennent à la santé, ont l'immunité contre une seconde atteinte de la maladie.

On peut, en chauffant pendant une demi-heure ce bacille à une température de 55°, l'atténuer de façon à le rendre inoffensif pour les poules à l'égard desquelles il joue le rôle d'un véritable vaccin.

A côté des microbes qui sont la cause ordinaire des angines diphtéritiques humaines, on trouve chez l'homme des cas d'angines à fausses membranes produits par le bacille de la diphtérie aviaire.

STATISTIQUE DE L'INSTITUT PASTEUR

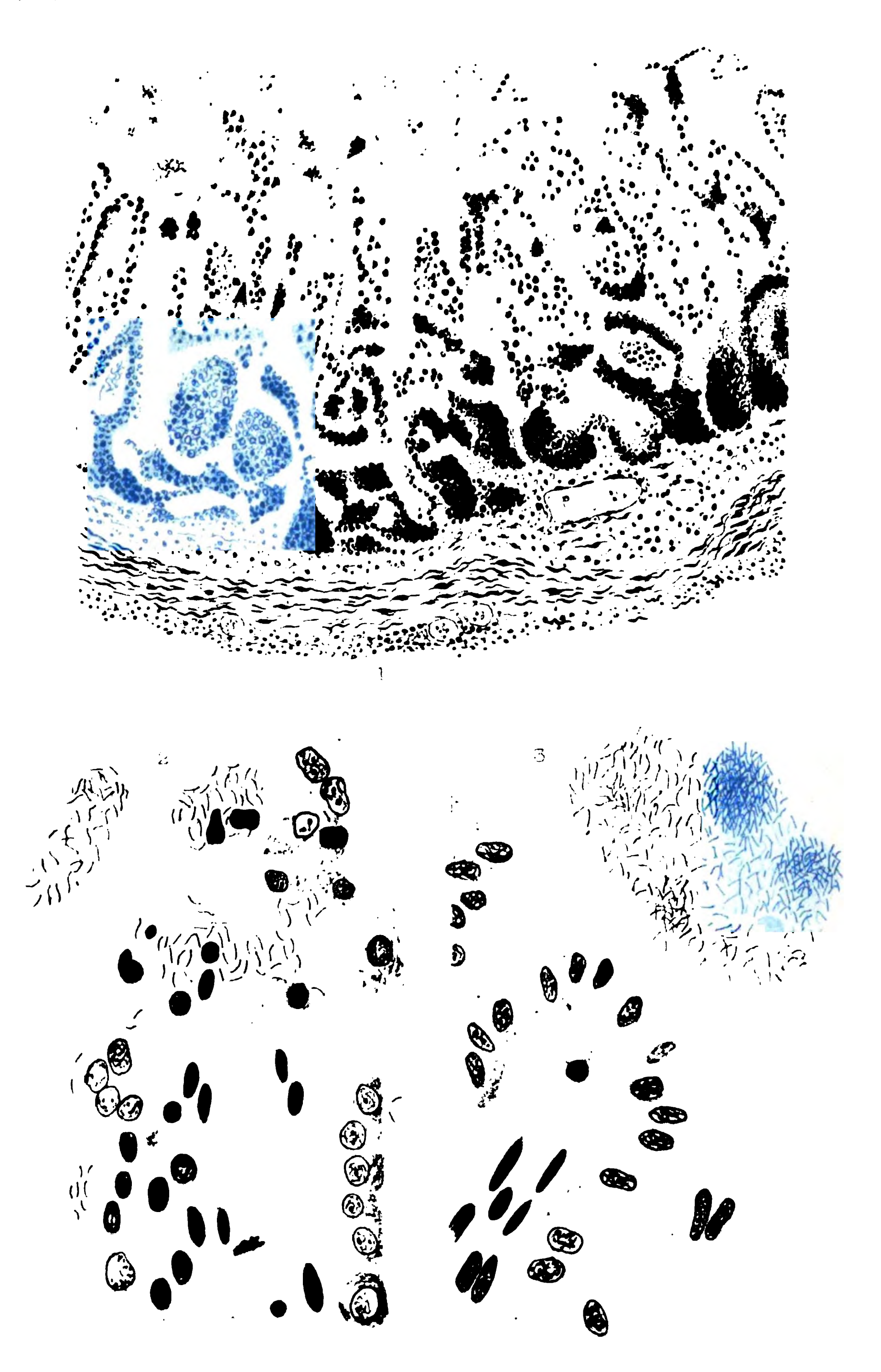
AVRIL, MAI, JUIN 1894

	A			B			C		
Morsures à la tête et à la figure — simples	»	»	»	»	1	2	»	1	3
— multiples	»	»		»	1		»	2	
Cautérisations efficaces	»	»	»	»	»	»	»		»
— *inefficaces*		»	»	»	»	»	»	»	»
Pas de cautérisation		»	»	2	»	»	3	»	»
Morsures aux mains — simples	»	1	4	»	15	28	»	11	24
— multiples	»	3		»	13		»	13	
Cautérisations efficaces	»	»	»	»	»	»	»	»	»
— *inefficaces*	3	»	»	13	»	»	12	»	»
Pas de cautérisation	1	»	»	15	»	»	12	»	»
Morsures aux membres et au tronc — simples	»		1	»	6	19	»	11	27
— multiples	»	1		»	13		»	16	
Cautérisations efficaces	»	»	»	»	»	»	»	»	»
— *inefficaces*	»	»	»	7	»	»	16	»	»
Pas de cautérisation	1	»	»	12	»	»	11	»	»
Habits déchirés		»	»	10	»	»	21	»	»
Morsures à nu	1	»	»	9	»	»	6	»	»
Morsures multiples en divers points du corps	»	»	»	»	1	1	»	1	1
Cautérisations efficaces	»	»	»	»	»	»	»	»	»
— *inefficaces*	»	»	»	»	»	»	1	»	»
Pas de cautérisation	»	»	»	1	»	»	»	»	»
Habits déchirés	»	»	»	»	»	»	»	»	»
Morsures à nu	»	»	»	1	»	»	1	»	»
Totaux. — Français et Algériens		5	5		43	50		49	55
— Etrangers		»			7			6	
		A			B			C	
TOTAL GÉNÉRAL					110				

Les animaux mordeurs ont été : chats, 7 fois; chiens, 103 fois.

Le Gérant : G. MASSON.

Sceaux. — Imprimerie Charaire et Cie.



E. Metchnikoff et V. Roussel del.

V. Roussel lith

Imp. A. Lafontaine & Fils, Paris.

8me ANNÉE SEPTEMBRE 1894 N° 9.

ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE LA DIPHTÉRIE
(SÉRUM-THÉRAPIE)

PAR

M. E. ROUX
Chef de service à l'Institut Pasteur.

M. L. MARTIN
Préparateur à l'Institut Pasteur, Interne des Hôpitaux.

La sérum-thérapie est restée à l'ordre du jour de la médecine, depuis que MM. Behring et Kitasato ont fait connaître les propriétés du sérum des animaux immunisés contre le tétanos et la diphtérie. Comment, en effet, ne pas donner toute son attention à ces « antitoxines », qui se présentent comme les remèdes scientifiques et spécifiques de deux maladies des plus graves, si mal combattues, jusqu'ici, par les moyens empiriques? L'antitoxine tétanique a été étudiée la première, parce qu'elle est plus facile à obtenir, et que son action préventive se manifeste avec une merveilleuse puissance. Dans la pratique elle n'a pas justifié toutes les espérances, et tout le monde, croyons-nous, convient aujourd'hui que si elle est toujours utile dans le tétanos, elle n'est pas un remède certain. Cela tient, sans doute, à ce que nous ne reconnaissons le tétanos qu'au moment où apparaissent les contractures, c'est-à-dire quand l'empoisonnement est fait. Lorsque le traitement est entrepris, la maladie est entrée déjà dans sa phase dernière, il ne faut pas s'étonner que l'antitoxine soit si souvent inefficace. Heureusement, il n'en est pas de même pour la diphtérie. Celle-ci est également une maladie toxique, mais l'empoisonnement suit l'angine ou la laryngite, et nous sommes avertis, par la présence des fausses membranes dans la gorge ou le larynx, avant que la toxine ait fait son œuvre. Si, au lieu de siéger sur des parties du corps facilement

accessibles à l'examen, et de provoquer, dès le début, des symptômes difficiles à méconnaître, les fausses membranes diphtériques se développaient dans l'estomac ou l'intestin, par exemple, le mal se manifesterait à nous par les signes de l'empoisonnement diphtérique, à savoir : la pâleur de la face, l'albuminurie, les troubles respiratoires et cardiaques. Il serait trop tard alors pour intervenir, et l'antitoxine diphtérique ne serait pas un remède plus sûr que l'antitoxine tétanique. C'est à cette circonstance que la diphtérie est d'abord une affection localisée, naissant pour ainsi dire sous nos yeux, que nous devons d'être mieux armés contre elle.

Dans une série de publications[1], M. Behring, soit seul, soit avec l'aide de MM. Wernicke, Boer, Kossel et Knorr, a expliqué comment il immunisait les animaux, comment leur sérum agissait sur la toxine et se montrait préventif et thérapeutique sur les cobayes et les lapins intoxiqués avec le poison diphtérique ou inoculés avec le bacille vivant. Ensuite, MM. Behring et Ehrlich, avec le concours de MM. Boer, Kossel et Wassermann, ont donné les premiers résultats de la sérum-thérapie chez les enfants atteints de diphtérie. Nous aussi, depuis l'année 1891, nous avons poursuivi des expériences sur le traitement de la diphtérie par le sérum antitoxique, d'abord sur les animaux, puis sur des enfants. Avant de rien publier sur le sujet, nous avons voulu rassembler des faits en assez grand nombre pour

1. Nous indiquons les principales publications faites sur la sérum-thérapie, et auxquelles nous faisons allusion dans ce mémoire.
1° Behring und Kitasato, *Deutsche medicin. Wochenschr.*, p. 113, n° 49, 1890. — Behring, *Deutsche medicin. Wochenschr.*, p. 1145, n° 50, 1890. — Behring und Nissen, *Zeitschrift für Hygiene*, p. 412, Bd. VIII, 1890. — Behring, *Zeitschrift für Hygiene*, p. 395, Bd. IX, 1890. — Behring, *Deutsche medicin. Wochenschr.*, n° 52, 1891. — Behring und Wernicke, *Zeitschr. für Hygiene*, p. 10, Bd. XII, 1892. — Behring, *Zeitschr. für Hygiene*, p. 45, Bd. XII, 1892. — Behring, Boer und Kossel, *Deutsch. medicin. Wochenschr.*, n°s 17, 18, 1893. — Behring, *Deutsch. medicin. Wochenschr.*, n° 23, 1893. — Behring, *Deutsch. medicin. Wochenschr.*, n°s 24, 25, 1893. — Behring und Knorr, *Zeitschr. für Hygiene*, Bd. XIII, 1893. — Behring, *die Blutserumtherapie*, I, II, 1893. — Behring, *Gesammelte Abhandlungen für œtiologischen Therapie von ansteckenden Krankheiten*, 1893. — Behring, *Deutsche medicin. Wochenschr.*, n° 8, 1894. — Behring, *Infection und Desinfection*. Leipzig, 1894. — Behring und Boer, *Deutsch. medicin. Wochenschr.*, n° 21, 1894. — Behring und Ehrlich, *Deutsch. medicin. Wochenschr.*, n° 20, 1894. — Ehrlich, *Deutsch. med. Wochenschr.*, n°s 32 et 44, 1891. — Ehrlich, Kossel und Wassermann, *Deutsch. medicin. Wochenschr.*, n° 16, 1894. — Hans Aronson, *Berlin. Klin. Wochens*, 19 juin 1893. — Hans Aronson, *Berlin, Klin. Wochensch.*, 1894. — Ehrlich und Kossel, *Zeitsch. für Hygiene*, 11e Bd. 1894. — D. Funck, *Zeitsch. für Hygiene*, 1894, 17e Bd. — Brieger und Georg. Cohn, *Zeitsch. für Hyg.*, 15e Bd., 1892

bien juger la méthode. Aujourd'hui, nous pouvons déclarer que nos résultats confirment, dans ce qu'ils ont d'essentiel, ceux de M. Behring et de ses collaborateurs[1].

I

PRÉPARATION DE LA TOXINE DIPHTÉRIQUE

Les animaux fournisseurs du sérum antitoxique sont immunisés contre la diphtérie, c'est-à-dire qu'ils sont accoutumés à la toxine diphtérique. La préparation de celle-ci se trouve donc à la base de la sérum-thérapie, et il est d'autant plus nécessaire d'en dire quelques mots, qu'on en consomme beaucoup pour immuniser les grands animaux et maintenir leur sérum à un degré suffisant d'activité.

La toxine est produite en cultivant le bacille diphtérique virulent dans du bouillon, au contact de l'air. Dans les conditions habituelles, il faut maintenir les cultures pendant des mois à la température de 37° pour que le poison s'y accumule. Un procédé plus rapide a été recommandé par MM. Roux et Yersin ; il consiste à faire la culture dans un courant d'air humide. On se sert de vases à fond plat, munis d'une tubulure latérale (vases de Fernbach) dans lesquels on met du bouillon alcalin peptonisé à 2 0/0, de façon que la couche liquide ait une faible épaisseur. Après stérilisation à l'autoclave, on sème du bacille diphtérique récent, très virulent, et on porte à l'étuve à 37°. Lorsque le développement est bien commencé, la tubulure de chaque ballon est reliée par un tube de caoutchouc à un ajutage d'un tuyau de cuivre qui est lui-même en relation avec une trompe à eau. Au moyen de pinces à vis, placées sur les tubes de caoutchouc, il est facile de régler le courant d'air qui pénètre par le col de chacun des matras, après avoir barboté dans un flacon laveur. Cet agencement est préférable à celui qui dispose les vases de culture les uns à la suite des autres, et les fait tous traverser par le même courant d'air. Après trois semaines, un mois au plus, la culture est suffisamment riche en toxine pour être employée. Sur le fond des vases, on voit un fort dépôt de microbes, et, à la surface, un

1. Nos premiers résultats sur le traitement des enfants ont été communiqués par M. Roux dans une conférence faite à Lille, au mois de mai 1894, devant la Société des Amis des sciences.

voile formé de bacilles plus jeunes. A ce moment la réaction est fortement alcaline. Tous les bacilles diphtériques, même lorsqu'ils paraissent également virulents pour les cobayes, ne donnent pas les mêmes quantités de toxine dans les cultures. L'essai de bacilles de diverses provenances fera reconnaître ceux qui fabriquent la toxine la plus active. Nous n'étonnerons aucun bactériologiste en disant que la force de la toxine n'est pas toujours la même dans des cultures faites, en apparence, dans des conditions identiques. Aussi est-il préférable de faire une provision de toxine qui servira pendant toute une série d'expériences, afin que celles-ci soient bien comparables entre elles.

Les cultures achevées sont filtrées sur une bougie Chamberland, et le liquide clair est gardé dans des vases bien remplis, bouchés et tenus à l'abri de la lumière, à la température ordinaire. Ainsi préparée, la toxine tue d'ordinaire un cobaye de 500 grammes en 48 heures à la dose de 1/10e de c. c. Elle perd son activité à la longue, mais lentement si on la maintient dans les conditions que nous venons de dire.

II

IMMUNISATION DES ANIMAUX

M. Carl Fränkel, le premier, a immunisé des cobayes contre la diphtérie en leur injectant, avec ménagement, de la toxine modifiée par le chauffage à 70°. Puis, M. Behring a recommandé les mélanges de toxine et de trichlorure d'iode. Il préfère aujourd'hui injecter de très petites doses de toxine pure, à des intervalles suffisants pour que les animaux restent bien portants. MM. Brieger et Wassermann arrivent au même résultat en injectant une culture du bacille diphtérique dans le bouillon de thymus, après l'avoir chauffée à 65°, 70°, pendant un quart d'heure. Tous ces procédés réussissent; mais il faut bien savoir qu'immuniser solidement de petits animaux, tels que lapins et cobayes, est toujours une opération longue et délicate.

La méthode à laquelle nous donnons la préférence est celle des toxines iodées [1] qui a été mise en usage par MM. Roux et Vaillard dans leurs recherches sur le tétanos. La toxine diphtérique additionnée d'iode est beaucoup moins dangereuse que la

1. Les hypochlorites alcalins et l'hypochlorite de chaux peuvent aussi servir à modifier la toxine diphtérique, et à la rendre vaccinale.

toxine pure. On ajoute à la toxine 1/3 de son volume de liqueur de Gram, au moment même de l'employer, et après quelques instants, on injecte le mélange sous la peau. Un lapin de moyenne taille supporte d'emblée 1/2 c. c. de ce liquide ; au bout de quelques jours, on renouvelle l'injection, et on continue ainsi pendant quelques semaines : alors on peut augmenter les doses de toxine iodée, ou diminuer la proportion d'iode. Plus tard on donnera de la toxine pure. Il faut peser fréquemment les animaux et interrompre les injections quand ils diminuent de poids, sans quoi on les amènerait à un état de cachexie qui se terminerait par la mort. Dans ces expériences, aller lentement c'est gagner du temps.

Les chiens immunisés contre la diphtérie ont fourni à plusieurs expérimentateurs, tels que MM. Barduch et Aronson, un sérum très actif. Les moutons, et surtout les chèvres, sont très sensibles à l'action du poison diphtérique. M. Behring, qui a immunisé, le premier, un certain nombre de ces animaux, insiste sur ce point, et nous avons pu constater, dans des expériences entreprises avec M. Nocard, combien il a raison. Les chèvres qui reçoivent de la toxine diphtérique tombent, quelquefois, même longtemps après le début de l'expérience, dans un état d'amaigrissement et de faiblesse extrêmes. Cependant, le sérum de ces animaux cachectiques manifeste des propriétés préventives quand on l'injecte aux cobayes.

L'immunisation des femelles qui donnent beaucoup de lait, comme les chèvres et les vaches, présente un intérêt tout particulier, parce que l'antitoxine passe dans le lait, ainsi que M. Ehrlich nous l'a appris. Une vache en lactation, et bien immunisée, est une source d'antitoxine. Le lait qu'elle donne est, sans doute, bien moins actif que son sérum, mais il est possible de condenser, sous un petit volume, l'antitoxine qu'il contient ; il constitue donc une bonne matière première pour la préparation de l'antitoxine.

Avec le concours de M. Nocard, nous avons immunisé des vaches et nous avons appris, à nos dépens, combien elles sont sensibles au poison diphtérique. Une d'entre elles a succombé, en cours d'immunisation, à la suite de l'injection de 5 c. c. de toxine. Outre des lésions locales étendues, on a trouvé, à l'autopsie, une néphrite parenchymateuse des plus prononcées.

Il convient donc de procéder chez les vaches et les chèvres avec beaucoup de ménagements, de ne donner que de faibles doses de toxine iodée au début, et de n'injecter de la toxine pure qu'après avoir constaté que le sang possède un certain degré de pouvoir antitoxique. Il est prudent aussi de commencer l'immunisation assez longtemps avant la parturition, car, au moment de la mise-bas, la sensibilité au poison est encore augmentée.

De tous les animaux capables de fournir de grandes quantités de sérum antidiphtérique, le cheval est le plus facile à immuniser. Il supporte la toxine beaucoup mieux que toutes les espèces dont nous venons de parler. Il n'est pas rare de rencontrer des chevaux chez lesquels 2 à 5 c. c. de toxine forte, injectée d'emblée, sous la peau, ne provoquent qu'une fièvre passagère et un œdème local promptement dissipé [1]. Si on admet, avec M. Behring, qu'un animal fournit un sérum d'autant plus antitoxique que sa sensibilité à la toxine est plus grande, le choix du cheval peut sembler mauvais. Cependant, dès l'année 1892, avec M. Nocard, nous avons entrepris d'immuniser des chevaux contre la diphtérie, parce que les expériences de MM. Roux et Vaillard, sur le tétanos, avaient montré que le sérum de cheval, même à des doses considérables, est inoffensif pour les animaux de laboratoire et aussi pour l'homme. Injecté sous la peau, il est résorbé en quelques instants, sans amener de réaction locale. De plus, rien n'est facile comme de tirer de la jugulaire d'un cheval, aussi souvent que l'on veut, et avec pureté, de grandes quantités de sang d'où se sépare un sérum d'une limpidité parfaite. Nous avons des chevaux dans la jugulaire desquels on a puisé plus de vingt fois, au moyen d'un trocart de gros calibre, et le vaisseau est resté aussi souple et aussi perméable qu'au premier jour. Le pouvoir immunisant de leur sérum est actuellement voisin de 100,000 : il est facile de l'augmenter encore.

Nos chevaux immunisés ne sont pas des animaux de prix; ce sont des chevaux de fiacre encore jeunes (6 à 9 ans) se nour-

1. L'âne supporte moins bien la toxine diphtérique; un ânon de 6 mois, de taille moyenne, auquel on a injecté d'emblée 1 c. c. de toxine très forte, a eu, pendant quelques heures seulement, une élévation de température jusqu'à 40°, avec un œdème assez étendu. Le lendemain, la température était normale, l'appétit revenu, et le 6e jour, l'œdème disparaissait. Mais il a succombé à l'injection d'une ouvelle dose de 1 c. c. faite huit jours après la première.

rissant bien, n'ayant aucune lésion des organes internes, surtout des reins, mais rendus impropres à un service actif par des tares aux membres. Avant toute chose, on s'est assuré qu'ils ne réagissent pas à la malléine, et que, par conséquent, ils ne sont pas morveux. On trouvera, dans l'Appendice qui suit ce Mémoire, des détails sur l'immunisation de quelques-uns de ces animaux. Nous nous contenterons de donner ici un exemple de la rapidité avec laquelle on peut immuniser certains chevaux, et rendre leur sérum assez antitoxique pour le traitement des enfants diphtériques.

Exp. — Cheval de 7 ans, du poids de 400 kilogrammes environ. La toxine employée est très active : elle tue un cobaye de 500 grammes en 48 heures, à la dose de 1/10 de c. c. Elle est injectée sous la peau de l'encolure ou en arrière de l'épaule.

1er jour de l'expérience.	Injection de	1/4 c. c.	Toxine iodée au 1/10. Pas de réaction ni locale ni générale.	
2e —	—	1/2 c. c.	Toxine iodée au 1/10.	
4e, 6e, 8e jour.	—	—	—	
13e, 14e —	—	1 c. c.	—	Pas de réaction.
17e jour.	—	1/4 c. c.	Toxine pure, léger œdème, sans fièvre.	
21e —	—	1 c. c.	Toxine pure, léger œdème, sans fièvre.	
23e —	—	2 c. c.	Toxine pure, léger œdème.	
25e —	—	3 c. c.	—	
28e —	—	5 c. c.	—	
30e, 32e, 36e jour.	—	5 c. c.	—	
39e, 41e jour.	—	10 c. c.	—	
43e, 46e, 48e, 50e jour.	—	30 c. c.	—	Œdème assez prononcé dissipé en 24 heures.
53e jour.	—	60 c. c.	—	—
57e, 63e, 65e, 67e jour.	—	60 c. c.	—	—
72e jour.	—	90 c. c.	—	—
80e —	—	250 c. c.	—	—

En 2 mois et 20 jours, ce cheval a donc reçu plus de 800 c. c. de toxine, sans avoir présenté autre chose qu'un œdème local passager et une augmentation de température de 1° environ, le soir des jours où l'injection a été copieuse. N'est-ce pas là un remarquable exemple de la tolérance des chevaux vis-à-vis du poison diphtérique? Ils se comportent comme les poules auxquelles on injecte de la toxine tétanique ; celles-ci ne sont pas sensiblement affectées, même par des doses considérables, et, cependant, au bout de quelques jours, leur sang est antitoxique [1].

1. Devant cette indifférence des chevaux vis-à-vis de la toxine diphtérique, nous nous sommes demandé si le sérum de chevaux neufs, n'ayant jamais reçu

Le jour même où le cheval dont nous parlons a été saigné (87e jour de l'expérience), il a supporté l'introduction dans la jugulaire de 200 c. c. de toxine diphtérique sans en être incommodé. Le soir il a eu un peu de fièvre, mais son appétit était conservé.

Le sérum recueilli a un pouvoir préventif supérieur à 50,000; c'est-à-dire qu'un cobaye résiste à l'inoculation de 1/2 c. c. de culture diphtérique récente et très virulente, si on lui a injecté, 12 heures avant, une quantité de sérum égale à la cinquante millième partie de son poids. Un mélange de un dixième de c. c. de ce sérum et de un c. c. de toxine diphtérique ne provoque aucun œdème chez les cobayes qui le reçoivent sous la peau.

Le cheval est donc l'animal de choix pour la préparation du sérum antidiphtérique. Son indifférence au poison de la diphtérie évite à l'expérimentateur les difficultés qu'il éprouve avec des espèces plus sensibles.

Une fois les chevaux amenés à un degré d'immunisation suffisante, par les injections sous-cutanées, vaut-il mieux les entretenir en introduisant fréquemment des doses modérées de toxine dans le tissu cellulaire, ou faire pénétrer de temps en temps dans leurs veines de grandes quantités de toxine? Le second procédé est le plus commode; on injecte la toxine (300 c. c. à 500 c. c.) au moment même où on fait la saignée, et on laisse reposer l'animal pendant une vingtaine de jours, jusqu'à la saignée suivante[1], mais il est moins efficace. Dans des essais sur l'immunisation des animaux contre le tétanos, MM. Vaillard et Roux ont reconnu que l'on obtient le sérum tétanique le plus actif, en multipliant les injections de doses relativement petites de toxine. Il en est de même pour la diphtérie; il semble que les cellules doivent être fréquemment excitées pour sécréter sans cesse l'antitoxine.

de toxine diphtérique, avait un pouvoir antitoxique. Le sérum d'un cheval, avant toute expérience, a procuré une survie de quelques jours, sur les témoins, aux cobayes qui l'ont reçu, et qui ensuite ont été éprouvés par une culture de bacilles diphtériques. Ce cheval a supporté d'emblée l'injection sous-cutanée de 5 c. c. de toxine diphtérique, sans malaise aucun. Un œdème qui a duré 12 heures s'est formé au point d'injection, et la température s'est élevée le soir de 0°,5.

1. D'ordinaire, on ne puise le sérum qu'une vingtaine de jours après que le cheval a reçu la toxine. Ce délai est-il nécessaire? Nous ne le pensons pas : en cas de nécessité on pourrait saigner l'animal beaucoup plus tôt, sans craindre que le sérum ait des propriétés nocives.

Dans l'Appendice qui fait suite à ce travail, on trouvera l'observation d'un cheval immunisé (obs. II), chez lequel on a pratiqué des injections espacées, mais copieuses, de toxine. Son sérum n'est pas plus actif que celui du cheval dont nous venons de parler. Cet animal a toujours manifesté une sensibilité un peu plus grande au poison dipthérique : chez lui les injections sous-cutanées provoquent un œdème plus étendu, et les injections intraveineuses de 300 c. c. à 500 c. c. de toxine ont quelquefois causé des troubles rapides, mais passagers. Immédiatement après l'opération, il est pris de crampes, il chancelle sur les membres postérieurs; pendant une minute ou deux il faut le soutenir; il sue abondamment, son pouls est petit, puis, en quelques instants, tout rentre dans l'ordre. Le soir, la température est élevée, l'appétit très diminué, mais le lendemain le cheval est en parfaite santé. De nos six chevaux, celui-ci est le seul qui ait présenté des symptômes semblables. Tant que la toxine a été mise sous la peau, il n'a pas éprouvé de malaise sérieux; la formation d'un œdème local était la seule chose à noter.

Un autre cheval a beaucoup plus réagi sous l'influence du poison diphtérique. On a commencé à lui donner 40 c. c. de toxine chauffée à 65°, en 8 injections, pratiquées dans l'espace de 10 jours. Celles-ci n'ont produit aucun effet appréciable ; alors, on lui a injecté 1 c. c. de toxine pure : l'œdème a été considérable et a fait place à une plaque indurée qui était encore sensible après une semaine. L'état général était altéré ; l'animal, abattu, ne mangeait pas, sa température atteignait 40°,5. Sept jours après, nouvelle injection de 1/2 c. c. de toxine : mêmes phénomènes locaux et généraux, si bien qu'on renonce à lui donner de la toxine pure, et qu'on lui injecte de la toxine iodée qui ne provoque qu'une tuméfaction locale sans symptômes généraux. Ce n'est qu'au bout d'un mois que l'on revient à la toxine pure. Alors la réaction est moins forte, mais l'abattement reparaît si on force les doses. L'histoire de ce cheval est intéressante : ce n'est pas un cheval neuf, mais bien un cheval ayant déjà servi à une autre expérience. Un an avant d'être soumis à la toxine diphtérique, il avait été inoculé avec du pneumocoque de Talamon-Frænkel, très virulent. La première inoculation avait provoqué un œdème énorme, une fièvre très forte, 40°,8, et un

abattement marqué pendant une semaine. 20 jours après, nouvelle inoculation de pneumocoque, température de 40°,8, gonflement étendu, malaise prononcé pendant 8 jours. Un mois après, même inoculation, même réaction générale, même œdème terminé par un abcès. Sans entrer ici dans d'autres détails, nous ferons remarquer que la troisième inoculation du pneumocoque donne lieu à des effets aussi intenses que la première.

C'est à ces inoculations de pneumocoque que nous avons attribué la sensibilité particulière de ce cheval pour le poison diphtérique. Beaucoup de faits nous confirment dans cette idée. Chaque fois, que l'on injecte de la toxine diphtérique, à un animal qui a déjà subi l'action de quelque poison microbien, alors même qu'il paraît rétabli depuis longtemps, il se montre beaucoup plus sensible que les animaux neufs. Les femelles pleines, ou qui ont mis bas depuis peu, sont aussi bien moins résistantes. Il faut se rappeler ces particularités, et ne pas tenir pour neufs des animaux bien portants en apparence, mais qui ont déjà servi à quelque expérience. Les cellules de l'organisme qui ont été en contact avec des produits microbiens en gardent, en général, longtemps le souvenir. Si quelque expérimentateur rencontre des chevaux très sensibles à la toxine diphtérique, qu'il recherche s'ils n'ont pas eu antérieument quelque maladie infectieuse!

Les chevaux supportent bien, non seulement les injections de toxine, mais aussi les inoculations de bacille diphtérique vivant et très virulent. On trouvera, dans l'Appendice, l'observation détaillée, prise par M. Nocard, d'un cheval qui a reçu depuis l'année 1892 des centaines de c. c. de cultures diphtériques récentes. Pendant la première phase de l'expérience, les inoculations ont été faites sous la peau avec des doses variant de 2 à 5 c. c. : chacune d'elles a causé un gonflement rapide, œdémateux à la périphérie, dur au centre, diminuant rapidement de volume pour ne laisser qu'un noyau induré, long à disparaître, mais qui ne suppure pas. En même temps que se produisait la tuméfaction locale, la température s'élevait vers 39°, pour retomber à la normale le lendemain ou le surlendemain. Malgré cet état fébrile passager, on ne peut pas dire que la santé de l'animal ait été un instant menacée. Dans la seconde phase de l'expérience, la fièvre qui suit les inoculations est insignifiante, les tumeurs

se développent moins vite, mais, après quelques jours, le point dur central se ramollit et s'abcède. La réaction générale est devenue moindre, mais la *réaction phagocytaire est beaucoup plus forte*. Le pus ensemencé donne des cultures pures de bacille diphtérique virulent. Ce cheval est un étalon breton que toutes ces inoculations successives ont rendu hargneux; on le châtre pour qu'il soit plus maniable. Dans la troisième phase de l'expérience on injecte les cultures dans les veines à la dose de 25 c. c.; la fièvre est peu élevée et sans durée; deux fois un peu de la culture a pénétré dans la gaîne du vaisseau et a déterminé un engorgement vite disparu. Le cheval devient de plus en plus insensible : une injection sous-cutanée ne provoque plus qu'une tuméfaction passagère. Près d'un litre de culture virulente a été introduit dans le corps de cet animal, et l'expérience a duré deux ans. Le pouvoir antitoxique de son sérum est alors de 10,000. Pour l'accroître rapidement, on fait, dans les veines, des injections de grandes doses de toxines mêlées à de la culture virulente. Le tout est bien supporté, et le pouvoir antitoxique devient voisin de 100,000.

Nous avons aussi immunisé des lapins en leur injectant de temps en temps, tout à l'extrémité de l'oreille, sous la peau de la face interne, de très petites doses de cultures dipthériques virulentes. En ayant soin d'espacer les inoculations, ils deviennent réfractaires au virus vivant et à la toxine.

III

SÉRUM ANTIDIPHTÉRIQUE

Lorsqu'on ajoute du sérum, d'un animal immunisé contre la diphtérie, à de la toxine diphtérique, celle-ci devient inoffensive. Le mélange fait en proportions convenables, injecté aux animaux, ne leur cause aucun trouble, et ne détermine même pas de lésion locale. La toxine paraît saturée. Cette action ne s'exerce pas seulement *in vitro*, elle se produit aussi dans le corps. Un cobaye, auquel on donne une dose suffisante de sérum, supportera ensuite une quantité de toxine diphtérique, sûrement mortelle pour les cobayes non préparés. On peut même injecter d'abord la toxine, et, plusieurs heures après, le sérum; l'animal ne périra pas. Il va sans dire que la quantité de sérum, nécessaire pour

le sauver, varie suivant son poids, suivant la dose de toxine, et aussi suivant le moment de l'intervention. Le sérum est préservateur et thérapeutique, non seulement vis-à-vis de la toxine, mais aussi envers le virus vivant. Ces propriétés du sérum antidiphtérique ont été découvertes par M. Behring : elles sont la base du traitement de la diphtérie. Elles sont dues à une substance spéciale qu'on appelle « antitoxine », et dont la nature nous est aussi inconnue que celle de la toxine diphtérique elle-même. Ces deux substances ont d'ailleurs des caractères communs; elles sont altérées par la chaleur, coagulées par l'alcool et entraînées par divers précipités amorphes que l'on fait naître dans les liquides où elles sont en solution. Ces particularités sont communes à presque toutes les substances préventives ou antitoxiques qui existent dans le sérum des animaux immunisés contre les diverses maladies infectieuses. Ce qui les distingue les unes des autres, c'est l'action spécifique de chacune sur un virus ou un poison déterminé.

Les animaux qui reçoivent l'antitoxine diphtérique deviennent réfractaires à la maladie, dans un temps très court. L'immunité est acquise sur-le-champ, pour ainsi dire, mais elle ne dure pas; elle s'efface peu à peu et disparaît, en quelques jours ou quelques semaines, selon la puissance et la proportion du sérum administré. Cette immunité fugace est bien différente de celle, péniblement acquise, mais durable, qui suit les injections ménagées et répétées du poison diphtérique.

Dès le début de la sérum-thérapie, on a senti la nécessité d'apprécier l'activité immunisante des sérums. M. Behring, le premier, a proposé un système de mesure qui consiste à estimer la force d'un sérum, d'après la quantité nécessaire pour immuniser 1 gramme d'animal, contre un volume de toxine donné, sûrement mortel, et injecté 12 heures après le sérum. Ainsi, 1 gramme de sérum actif au millième, immunise 1 kilogramme de cobaye contre une dose fixée de toxine, capable de tuer dans un délai connu. Évidemment, il ne s'agit pas là d'une appréciation bien rigoureuse, puisque l'instrument de mesure est un animal vivant, différent dans chaque essai, et ayant sa sensibilité propre. La notation étant commode, elle a été adoptée dans les études sur le tétanos et dans les premières expériences sur la diphtérie. Puis, M. Behring a proposé une autre unité de mesure

pour le sérum antidiphtérique, à savoir : la quantité de sérum nécessaire pour immuniser 5,000 grammes de cobaye (en opérant sur 10 cobayes de 500 grammes) contre une dose dix fois mortelle d'une culture diphtérique âgée de 2 jours, le sérum étant injecté un quart d'heure avant le virus. La dose mortelle simple est de $0^{cc},25$ pour un cobaye de 300 à 400 grammes. Dans ce cas, on appréciait la propriété thérapeutique du sérum contre l'infection et non contre l'intoxication. Depuis quelque temps, cette façon de mesurer a fait place à une autre. Pour M. Ehrlich, d'accord avec M. Behring, l'unité immunisante est représentée par $0^{cc},1$ d'un sérum, qui, mélangé à $0^{cc},8$ de toxine normale, la neutralise, au point que le tout, injecté sous la peau d'un cobaye, ne produit aucun œdème. La toxine normale est celle dont $0^{cc},3$ tue sûrement 1 kilogramme de cobaye. Ici, le critérium est la formation de l'œdème chez le cobaye. Pour faire une mensuration, acceptée par ceux qui adoptent la nouvelle unité immunisante, il faudrait opérer simultanément avec le sérum à éprouver et avec le sérum et la toxine étalons de MM. Behring et Ehrlich. A vrai dire, nous n'attachons pas beaucoup d'importance à toutes ces définitions compliquées, et nous pensons que c'est se donner trop de mal que de chercher une précision que la nature du sujet ne comporte pas. L'essentiel est de se comprendre ; à notre avis, cela était plus facile quand on disait simplement d'un sérum que son pouvoir immunisant est de 1,000 ou de 100,000 vis-à-vis d'une toxine ou d'un virus tuant les témoins en tant d'heures. Cependant, il était nécessaire de parler de ces unités de mesure, puisqu'elles sont employées à chaque instant dans les travaux allemands.

Pour donner une idée de l'activité du sérum qui nous a servi dans nos essais sur les enfants et sur les animaux, nous citerons quelques expériences. La toxine que nous employons tue sûrement, en 48 heures, et à la dose de 1/10 de c. c., un cobaye de 500 grammes. Or, le mélange de 1/10 de c. c. de sérum et de $0^{cc},9$ de toxine ne cause aucun œdème au cobaye qui le reçoit sous la peau. 1 c. c. d'un mélange contenant seulement 1/20 de c. c. de sérum ne donne pas davantage de tuméfaction. Il n'y a pas non plus de réaction locale lorsqu'on injecte 1 c. c. du mélange contenant 1/30 de sérum. 1 c. c. du mélange au 1/50 cause un léger œdème, mais le cobaye reste bien portant. N'est-il pas

surprenant de voir qu'une si petite portion de sérum, ajoutée à la toxine, empêche celle-ci de faire un œdème chez le cobaye, tandis que sur le cheval, fournisseur du sérum, chaque injection de toxine est suivie d'une tuméfaction notable?

Le pouvoir préventif du sérum se manifeste lorsqu'on donne celui-ci avant la toxine. Dans ces conditions, les animaux résistent toujours si la quantité du sérum est proportionnée à celle de la toxine. Il suffit que les cobayes aient reçu 12 heures auparavant un cent millième de leur poids de sérum pour qu'ils résistent à une dose de toxine qui tue les cobayes témoins en 5 jours. Avec un cinquante millième, ils supportent une injection de poison diphtérique mortelle en 48 heures pour les témoins.

Des doses de sérum, très supérieures à celles qui immunisent les animaux contre une injection de toxine sous la peau, sont inefficaces quand le poison est introduit dans les veines.

Si la toxine est introduite la première, il faut, pour sauver les animaux, d'autant plus de sérum qu'on intervient plus tard, et encore, après un certain délai, l'effet thérapeutique est nul. Parmi des cobayes auxquels on avait donné une dose de toxine, qui tue les témoins en 48-50 heures, ceux qui ont reçu, 6 heures après, un millième de leur poids de sérum ont survécu : ceux qui ont été traités de même après 12 heures sont morts.

Notre sérum injecté aux cobayes, 12 heures avant l'inoculation sous-cutanée d'une quantité de culture récente, mortelle en moins de 30 heures, les préserve toujours à la dose d'un cinquante millième de leur poids; ils n'ont même pas d'œdème prononcé. Une dose de un cent millième leur procure une survie de 6 à 15 jours, une dose de un cinq cent millième prolonge leur existence de 2 jours seulement.

Après l'inoculation sous-cutanée du bacille diphtérique, l'intervention est encore efficace à un moment où elle ne réussit plus, si on a injecté de la toxine. On peut guérir des cobayes en les traitant 12 et 18 heures après l'infection, alors que les témoins meurent en 24 à 30 heures. Tant que la température est élevée et que l'abaissement qui précède la mort n'a pas commencé, l'injection de fortes quantités de sérum peut être curatrice.

Beaucoup de ces cobayes qui ont été traités, par le sérum, dans des conditions variées, et qui ont survécu, deviennent cachectiques et finissent par succomber, parfois après des mois.

Lorsqu'on fait le compte de ceux qui subsistent après 6 mois ou un an, on est étonné de voir combien ils sont peu nombreux. Chez ces petits rongeurs, les conséquences d'un empoisonnement diphtérique même peu intense se font sentir à longue échéance.

Les animaux les mieux immunisés contre la diphtérie fournissent un sérum dont les propriétés antitoxiques n'approchent pas de celles que le sérum antitétanique manifeste vis-à-vis du poison du tétanos. Il est commun d'avoir du sérum antitétanique dont un volume neutralise, *in vitro*, des centaines de volumes de toxine, et qui est préventif au cent millionième et même au delà. Cependant, ce sérum si extraordinairement antitoxique ne guérit pas un tétanos déclaré, tandis qu'un sérum antidiphtérique, incomparablement moins actif, donne des résultats thérapeutiques bien meilleurs.

Quelle action l'antitoxine diphtérique exerce-t-elle sur la toxine? Ces deux substances mêlées ensemble se neutralisent-elles mutuellement, ou continuent-elles à exister l'une à côté de l'autre? Si elles ne se saturent pas, pourquoi les effets du poison ne se manifestent-ils plus? Nous avons dit qu'un mélange de une partie de sérum et de neuf parties de toxine, injecté sous la peau d'un cobaye, est si inoffensif qu'il ne lui donne même pas d'œdème. Il semble bien que toute la toxine soit détruite. Ne nous hâtons pas de conclure. Le même mélange, qui ne cause pas de tuméfaction appréciable chez le cobaye, provoque un œdème marqué dans le tissu cellulaire du lapin et le tue à la longue, si on l'introduit dans ses veines. Le résultat change suivant la façon de faire l'expérience. Sans vouloir traiter ici cette importante question doctrinale, nous dirons que le sérum antidiphtérique n'est pas antitoxique dans le sens propre du mot; ajouté à la toxine il la laisse intacte; injecté aux animaux il agit sur leurs cellules en les rendant, pour un temps, comme insensibles au poison. La preuve en est dans ce fait que la quantité de sérum, amplement suffisante à préserver, contre une dose mortelle de virus ou de toxine, les cobayes neufs, ne retarde pas la mort de cobayes de même poids, dont la résistance a été affaiblie par des inoculations antérieures de microbes ou des injections de produits microbiens. Si l'antitoxine détruisait la toxine, la même quantité de sérum se montrerait efficace chez tous les cobayes de même poids. Des cochons d'Inde en parfait

tat de santé, mais vaccinés plusieurs semaines auparavant contre le choléra, d'autres qui avaient subi l'action soit du virus gourmeux, soit celle du *micro-bacillus prodigiosus* ou du bacille de Kiel, ont été tués par le bacille ou la toxine diphtériques, sans retard sur les témoins, malgré qu'ils aient reçu avant l'épreuve du sérum antidiphtérique. Au contraire, des cobayes, vierges de toute inoculation antérieure, résistaient parfaitement alors qu'on leur donnait une dose plus faible de sérum thérapeutique. L'explication naturelle de ces faits n'est-elle pas dans l'action du sérum sur les cellules? Les cellules bien vivaces des cobayes neufs répondent à la stimulation du sérum; chez les cobayes, aussi vigoureux en apparence, mais qui ont déjà été impressionnés par des produits microbiens, elles restent sans défense devant la toxine. L'étude de la réaction phagocytaire dans la diphtérie a été entreprise, à l'Institut Pasteur, par M. Gabritchewski; les constatations auxquelles il est arrivé s'accordent avec l'idée que les sérums préventifs sont stimulants et non antitoxiques[1].

Le sérum que nous retirons des chevaux se conserve très-bien sans altération, car toutes les manipulations sont faites avec la plus grande pureté possible. Nous le gardons à l'obscurité, dans des flacons stérilisés, bien remplis, sans y ajouter autre chose qu'un morceau de camphre fondu. Le sérum desséché dans le vide est facile à transporter au loin, il retrouve ses propriétés préventives quand on le dissout à nouveau dans 8 ou 10 fois son poids d'eau pure. Cette solution donne une petite tuméfaction locale passagère, que ne produit pas le sérum naturel.

Il peut être utile de condenser, sous un faible volume, l'antitoxine trop diluée, celle du lait par exemple. Mais il nous semble inutile de précipiter celle du sérum pour la redissoudre ensuite. Pourquoi toutes ces manipulations, quand il est si facile d'avoir un sérum qui sort des vaisseaux plus actif que toutes les antitoxines prétendues concentrées?

IV

ACTION DU SÉRUM DANS LA DIPHTÉRIE DES MUQUEUSES.

La plupart des expériences sur la sérum-thérapie ont été faites sur des animaux inoculés sous la peau; M. Behring et ses

1. Voir à ce sujet dans ces *Annales*, mai 1892, le travail de M. Metchnikoff, *Sur le hog choléra*.

collaborateurs en citent quelques-unes, où la diphtérie était inoculée sur des muqueuses. Celles-ci sont surtout intéressantes, car en médecine pratique nous ne voyons pas le bacille diphtérique se développer au sein des tissus, mais à la surface de la gorge et du larynx, pour ainsi dire en dehors du corps. Provoquons donc la diphtérie sur les muqueuses des animaux, et voyons comment elle se comporte sous l'action du sérum : c'est la meilleure préparation au traitement de la diphtérie chez les enfants.

Rien n'est plus simple que de donner une diphtérie vulvaire et vaginale à un cobaye femelle ; on peut, comme l'a fait M. Lœffler, excorier la muqueuse, ou mieux encore, cautériser légèrement, avec une baguette de verre chauffée, la vulve et l'entrée du vagin, et ensemencer ensuite avec une culture de bacilles diphtériques virulents. Au bout de quelques heures, il y a de la rougeur et du gonflement des tissus ; une fausse membrane grisâtre, adhérente, s'étend sur la muqueuse œdématiée. La fièvre est forte, un écoulement se fait par le vagin, et, après 2 ou 3 jours, les symptômes de l'empoisonnement diphtérique se manifestent ; l'animal maigrit et succombe. Un grand avantage de ce procédé, c'est qu'il permet de suivre l'évolution de la lésion locale et de voir comment elle se modifie sous l'influence du traitement. Cette fausse membrane a la même structure que celles de l'enfant, elle contient des bacilles diphtériques et aussi des bactéries étrangères. Ce mode d'expérimentation, très commode, permet d'aborder la question des associations microbiennes dans la diphtérie.

1° *Sérum injecté préventivement.* — Les cobayes femelles résistent toujours si le sérum est injecté, à dose suffisante, avant l'inoculation sur la muqueuse du vagin. En procédant comme nous venons de le dire, il se forme, dans tous les cas, une fausse membrane ; mais, tandis que, chez les témoins, la muqueuse est rouge, œdématiée, que la température est élevée, que l'état général devient mauvais, chez les femelles traitées la rougeur est moins étendue, les tissus moins gonflés, la fièvre peu intense. Dès le second jour, les lésions locales diminuent, les fausses membranes se détachent et la réparation de la muqueuse commence. Des femelles de poids égaux ont été infectées de la même façon à la vulve : les unes, qui n'avaient pas eu de sérum,

sont mortes en 6 jours; les autres, qui en avaient reçu 1/10,000 de leur poids, ont très bien guéri. Quand la dose de sérum n'est pas assez forte, les animaux se rétablissent en apparence, mais succombent plus tard à la cachexie. Les choses se passent absolument de même si on injecte le sérum au moment de l'inoculation.

On peut aussi produire les fausses membranes à la face interne de l'oreille des lapins, d'abord en plaçant un anneau de caoutchouc à la base de l'oreille pour rendre celle-ci un peu œdémateuse, puis on brûle légèrement la peau et on ensemence avec du bacille diphtérique. L'anneau de caoutchouc est alors enlevé, l'exsudat maintient humide la surface de culture et celle-ci se recouvre d'une belle fausse membrane. En enlevant l'oreille à diverses phases de la maladie, il est très facile de suivre sur des coupes ce qui se passe dans les tissus.

2° *Sérum injecté après l'inoculation.* — La fausse membrane est déjà bien développée après 12 heures, et la rougeur et la tuméfaction de la vulve sont très prononcées. Si on injecte à ce moment le sérum à la dose de 1/10,000 à 1/10,00 du poids de l'animal, celui-ci guérit très bien. Quelques heures après, l'œdème s'arrête, puis le gonflement diminue, et, le deuxième jour, les fausses membranes se détachent. Lorsque la guérison de la muqueuse est complète, on ne trouve plus de bacilles diphtériques.

On est étonné de la rapidité avec laquelle se détachent les fausses membranes et disparaissent les bacilles chez les cobayes traités, quand on les compare aux témoins qui succombent avec des lésions étendues du vagin, vers le 5e ou le 6e jour.

3° *Action du sérum sur les animaux inoculés dans la trachée.* — La diphtérie du larynx et de la trachée est de beaucoup la plus grave chez l'enfant. La culture du bacille s'étend souvent au poumon : alors la surface d'absorption du poison est énorme et l'intoxication rapide. En outre, la gêne respiratoire oblige à recourir à la trachéotomie, et la plaie trachéale, en facilitant les infections secondaires du poumon, augmente le danger.

Pour bien juger de ce que le sérum peut donner dans la pratique, il était donc indiqué de l'employer chez des animaux auxquels on a donné la diphtérie trachéale et laryngée.

Les expériences peuvent être faites sur les cobayes et sur les lapins, elles sont plus faciles chez ce dernier animal. La manière d'inoculer la diphtérie dans la trachée est simple : on fait la trachéotomie en incisant petitement la trachée ; au moyen d'un fil de platine, on excorie la muqueuse, et on l'ensemence ensuite en introduisant le fil chargé de bacilles diphtériques. La plaie est refermée. Dès le lendemain, les animaux ainsi traités ont de la fièvre; au bout de 48 heures, la respiration est gênée et de plus en plus bruyante, à mesure que les fausses membranes se développent; on perçoit même, à distance, un bruit très caractéristique.

Les cobayes, auxquels nous donnions la diphtérie trachéale, mouraient d'ordinaire en 3 jours, quand ils n'étaient pas traités; les lapins succombaient entre 3 et 5 jours. Chez ces animaux, la trachée et le larynx étaient injectés, des fausses membranes adhéraient à la muqueuse et s'étendaient parfois jusqu'aux premières ramifications bronchiques. Les poumons, congestionnés par places, contiennent quelques bacilles diphtériques.

Les cobayes et les lapins inoculés dans la trachée, après qu'ils ont reçu du sérum, ne prennent pas la diphtérie, ou du moins celle-ci ne se traduit par aucun malaise apparent.

Expérience. Injection préventive de sérum avant la trachéotomie. — Trois lapins de 1,400, 1,450 et 1,700 grammes reçoivent respectivement sous la peau 1/1,000, 1/50,000, 1/100,000 de leur poids de sérum anti-diphtérique. 24 heures après ils sont trachéotomisés et inoculés dans la trachée en même temps que deux lapins témoins.

Les lapins témoins meurent, l'un le 3e, l'autre le 5e jour.

Le lapin au 1/1,000 a une élévation de la température pendant quelques heures après l'opération et reste très bien portant. Un mois après il pèse 1,700 grammes.

Le lapin au 1/50,000 a une fièvre d'un peu plus longue durée, mais résiste très bien ; il pèse 1,650 grammes un mois après.

Le lapin au 1/100,000 est malade pendant deux jours et paraît se rétablir. Le 6e jour, son état devient plus mauvais, sa respiration est difficile, sa température de 40°,8. Il meurt le 9e jour. A l'autopsie, on trouve dans la trachée une fausse membrane énorme, épaisse, allant jusqu'aux premières divisions bronchiques. Elle contient peu de bacilles diphtériques, mais beaucoup de bactéries étrangères.

Lorsque la quantité de sérum n'est pas suffisante, après un

temps d'arrêt la maladie reprend. Nous avons vu aussi des cobayes, inoculés dans la trachée, et auxquels on avait donné préventivement trop peu de sérum, faire une diphtérie bénigne, puis mourir après plus de deux mois avec des lésions des reins et des capsules surrénales.

Expérience. Sérum injecté après l'inoculation dans la trachée. — Quatre lapins de même poids sont inoculés dans la trachée le 2 août 1893. Un sert de témoin, il meurt le 3e jour avec une fausse membrane étendue et les lésions typiques.

Lapin témoin, poids 1,850 grammes. Opéré le 2 août 1893 à 7 h. du matin; temp. à 2 h. du soir, 39°,3; à 6 h., 40°,1; à 10 h., 40°,4. — Le 3 août matin, 39°,4. Soir, 38°,6. Le 4 août matin, 37°,2. Soir, 36. Mort dans la nuit.

Le second lapin, opéré dans les mêmes conditions, le 2 août, pèse 1,450 grammes. Une demi-heure après l'opération, on lui injecte 2 c. c. de sérum sous la peau. Temp. à 2 h. après-midi, 39°,3; à 6 h., 39°,3; à 10 h., 39°,1. Le 3 août, temp. matin, 39°,5; soir, 39°,4. Le 4 août, temp. matin, 39°,4; soir, 39°,4. Le 5 août, temp. matin, 39°,3. Le 6 août, temp. matin, 39°,2. L'animal reste très bien portant.

Le troisième pèse 1,500 grammes. Six heures après l'opération, on lui injecte sous la peau 5 c. c. de sérum.

Le 2 août, à 2 h. après-midi, temp. 39°,6; 6 h., 40°,1; 10 h., 40°,1. Le 3 août, temp. matin, 39°,6; soir, 39°,4. Léger œdème au-devant de la trachée. Le 4 août, temp. matin, 39°,0; soir, 39°,3. Le 5 août, temp. matin, 39°,1. Le 6 août, temp. matin, 39°,3. L'animal reste en bonne santé et engraisse.

Le quatrième lapin, du poids de 1,550 grammes, reçoit sous la peau 10 c. c. de sérum, 24 heures seulement après l'opération. Le 2 août, temp. à 2 h. après-midi, 39°,6; à 6 h., 40°,1; à 10 h., 40°,1. Le 3 août, temp. matin, 39°,6; soir, 39°,4, œdème au-devant de la trachée. Le 4 août, temp. matin, 39°0; soir, 39°,3. Le 5 août, temp. 39°,1. Le 6 août, temp. 39°,3. L'animal reste bien portant.

Cette expérience prouve combien l'injection du sérum est efficace pour arrêter une diphtérie déjà bien développée [1].

4° *Sérum antidiphtérique dans les diphtéries avec association.* — Les diphtéries dans lesquelles le bacille spécifique est associé à certaines bactéries, notamment aux streptocoques, sont parmi les plus graves que l'on puisse observer. Le plus souvent, le

1. Chez les animaux guéris par le sérum on n'observe pas de ces paralysies fréquentes après les injections de toxine ou de virus diphtérique. Cependant, un lapin, traité un peu tardivement par le sérum, a présenté, un mois après, de la paralysie des pattes postérieures et a succombé cachectique.

mal se propage aux poumons, qui montrent à l'autopsie des foyers de broncho-pneumonie où l'on trouve le bacille diphtérique et le streptocoque. MM. Roux et Yersin ont déjà réalisé, chez les animaux, ces infections mixtes : ils ont fait voir qu'un bacille diphtérique, assez peu virulent pour ne pas tuer les cobayes, devient meurtrier pour eux si on l'inocule en même temps qu'un streptocoque lui-même peu offensif. Le sérum antidiphtérique est-il capable de guérir ces diphtéries compliquées? C'est une question du plus haut intérêt à cause de la fréquence de ces formes mixtes chez les enfants. Elle a déjà été abordée par M. Funk, qui conclut de ses expériences que l'infection simultanée par le streptocoque et le bacille spécifique détermine une augmentation de la production de la toxine diphtérique, mais que la présence du streptocoque n'empêche en aucune façon l'action neutralisante du sérum sur la toxine diphtérique. Dans ces cas, pour obtenir des effets curatifs, il n'y a qu'à injecter davantage d'antitoxine.

M. Funk fait l'inoculation sous la peau; nous avons inoculé dans la trachée pour réaliser autant que possible les conditions de la pratique. Après trachéotomie, les lapins ont reçu dans la trachée un mélange de streptocoque et de bacille diphtérique. Le streptocoque avait été pris chez un enfant atteint de diphtérie : c'était donc un de ces streptocoques auxquels on a affaire dans les diphtéries associées naturelles. Isolé à l'état de pureté, il ne trouble pas le bouillon, il n'est pas très virulent pour le lapin. 2 c. c., d'une culture récente, en bouillon, injectés dans les veines d'un lapin, le tuent seulement en 10 jours. 1 c. c., introduit sous la peau, détermine une plaque érysipélateuse, avec fièvre passagère, sans troubles sérieux de la santé. La même dose mise dans la trachée d'un lapin trachéotomisé lui donne une courte élévation de température sans malaise prononcé [1]. Quant au bacille diphtérique que nous avons associé à ce streptocoque, il est virulent : c'est celui qui a servi dans toutes nos expériences antérieures.

L'expérience suivante va nous montrer comment évolue,

1. *Expérience.* — Un lapin reçoit le 30 juillet 1893, dans la trachée, 1 c. c. de culture de streptocoque en bouillon. Le 31 juillet, temp. matin, 40°,0, soir 39°,0. Le 1er août, temp. matin, 39°,0, soir 39°,2. Le 2 août, temp. matin, 39°,0. Le 3 août, temp. matin, 38°,6. Le 4 août, temp. matin, 38°,6. L'animal reste bien portant dans la suite.

chez les lapins non traités, la diphtérie associée au streptocoque et inoculée dans la trachée.

Expérience. — Le 27 juillet 1893, un lapin du poids de 1,800 grammes est trachéotomisé et inoculé avec le mélange streptocoque-diphtérie, le matin à 8 heures. A 2 heures soir, temp. 40°,0; à 10 heures soir, temp. 40°,9. L'animal est mourant le 28 juillet dans la matinée. — *Autopsie.* Trachée très enflammée, remplie de spume, avec fausses membranes adhérentes à une muqueuse ulcérée par places. Poumons œdémateux, avec foyers de broncho-pneumonie contenant le streptocoque et le bacille diphtérique en abondance. La rate est grosse : ensemencée, elle donne une culture pure de streptocoque.

L'association des deux microbes cause donc chez le lapin une diphtérie à marche rapide, comme on en voit chez les tout jeunes enfants. Le tableau anatomo-pathologiuue est le même. Dans lès deux cas il y a de la broncho-pneumonie avec sécrétion bronchique abondante.

Comment se comporte le sérum dans une maladie aussi grave? C'est ce que nous fait connaître l'expérience suivante :

Expérience. — Quatre lapins sont trachéotomisés et inoculés dans la trachée avec le mélange des deux microbes, le 2 août 1893, dans la matinée. Un sert de témoin, les trois autres sont traités après des temps variables.

a. Lapin témoin. Poids, 1,800 grammes. Temp. 2 heures après-midi, 40°,3; 6 heures soir, 41°,3; 10 heures soir, 41°, 3. — 3 août, temp. matin, 39°,6; soir, 39°,8. — 4 août, temp. matin, 39°,7; soir, 39°,8. — 5 août, temp. matin, 39°,9. Mort dans la journée.

b. Lapin du poids de 1,600 grammes, traité immédiatement après l'opération, par injection sous-cutanée de 2 c. c. de sérum. Temp. 2 heures soir, 40°,2; 6 heures soir, 40°,2; 10 heures soir, 40°,4. — 3 août, temp. matin, 39°,0, soir, 39°,1. — 4 août. Temp. matin, 39°,1; soir, 39°,4. — 5 août. temp. matin, 39°8. — 6 août, temp. matin, 39°,5. L'animal reste bien portant.

c. Lapin du poids de 1,560 grammes, traité 6 heures après l'opération, par injection sous-cutanée de 5 c. c. de sérum. Temp. 2 heures soir, 40°,5; 6 heures soir, 40°,9; 10 heures soir, 40°,6. — 3 août, temp. matin, 40°,2; soir, 41°,0. — 4 août, temp. matin, 41°,0; soir, 40°,9. — 5 août, temp. matin, 40°,7. — 6 août, temp. matin, 41°,5. — 7 août, matin, 40°,9. Meurt dans la nuit du 8 au 9. Survie de trois jours sur le témoin. A l'autopsie, il y a des fausses membranes dans la trachée et des foyers de broncho-pneumonie.

d. Lapin du poids de 1,600 grammes, traité 12 heures après l'opération, par injection sous-cutanée de 10 c. c. de sérum. Temp. 2 heures soir, 40°,8; 6 heures soir, 41°,4; 10 heures soir, 41°,6. — 3 août, temp. matin, 41°,0;

soir, 41°,0. — 4 août, matin, 40°,6; soir, 40°,0. — 5 août, matin, 39°,4. Meurt dans la nuit. A l'autopsie, fausses membranes dans la trachée, foyers de broncho-pneumonie. Le sang ensemencé donne une culture de streptocoque.

e. Lapin du poids de 1,760 grammes. Traité 24 heures après l'opération par injection sous-cutanée de 30 c. c. de sérum, il meurt le 5 août sans retard sur le témoin.

Le sérum qui a été employé est le même qui, injecté à la dose de 10 c. c., 24 heures après l'inoculation du bacille diphtérique pur dans la trachée, guérit très bien les lapins. La maladie causée par l'association du streptocoque au microbe de la diphtérie est donc bien plus difficile à guérir par le sérum que la diphtérie pure. Non pas qu'il y ait formation d'une plus grande quantité de toxine diphtérique, ou que l'action antitoxine du sérum soit empêchée, mais parce que les cellules frappées par le poison du streptocoque ne ressentent plus la stimulation de l'antitoxine. Dans d'autres expériences qu'il serait trop long de rapporter en détail, les animaux traités 12 heures après l'opération ont toujours succombé, malgré que les injections de sérum aient été répétées. Nous avons sauvé assez souvent les lapins traités après 6 et 8 heures en renouvelant *à plusieurs reprises* les injections de sérum thérapeutique. Il est très important d'injecter à nouveau du sérum pour assurer la guérison définitive.

Dans ces cas de diphtérie avec association de streptocoque, n'obtiendrait-on pas de meilleurs résultats en injectant simultanément du sérum antidiphtérique et du sérum de lapin immunisé contre l'érysipèle? M. le Dr Marchoux, qui travaille à l'Institut Pasteur, a mis à notre disposition du sérum de lapins, assez bien vaccinés contre le streptocoque pour ne pas souffrir de l'inoculation de grandes quantités de culture. Ce sérum, employé en même temps que l'antitoxine diphtérique, ne nous a pas donné de meilleurs résultats. Les animaux se sont comportés comme dans les expériences précédentes, avec cette seule différence qu'un lapin inoculé dans la trachée avec de la diphtérie pure a survécu plusieurs jours au témoin à la suite de l'injection de 5 c. c. du sérum anti-streptococique. Peut-être le sérum des lapins n'était-il pas suffisamment efficace contre l'espèce de streptocoque qui a été employée?

Après tous ces essais sur la préparation du sérum antidiphtérique et sur son action chez les animaux inoculés, nous étions préparés à entreprendre le traitement de la diphtérie chez les enfants; c'est ce que nous avons fait dans les six premiers mois de cette année; les résultats obtenus sont consignés dans le mémoire qui suit.

APPENDICE

I. Immunisation d'un cheval breton, entier, âgé de 3 ans, du poids de 420 kilogrammes. Observation de M. Nocard.

3 *avril* 1892. — On inocule, sous la peau de l'encolure, 2 c.c. d'une culture récente de bacille diphtérique très virulent, tuant un cobaye de 500 grammes en moins de 30 heures, à la dose de 1/5 de c. c. L'inoculation est faite le matin, la température étant de 37°,5. A huit heures du soir, elle est de 38°,8.

4 *avril*. — Temp. matin 38°,1; soir 38°,5. Petite tumeur au point d'inoculation

5 *avril*. — La tumeur a augmenté de volume; elle est aplatie et son centre est induré, tandis que la périphérie est molle. Temp. matin 37°,9; soir 38°,0.

6 *avril*. — La tumeur a la dimension de la main, elle est diffuse à son pourtour et dure au centre. Temp. matin 37°,7; soir 37°,7.

7 *avril*. — La tumeur est indolore; elle diminue. Temp. matin 37°,6; soir 37°,9.

Les jours suivants, la tumeur se réduit au volume d'une noix.

10 *avril*. — Nouvelle injection sous la peau de la paroi thoracique, en arrière de l'épaule droite, de 2 c. c. de culture diphtérique récente.

11 *avril*. — Temp. matin 39°,4; soir 40°,4. Tumeur diffuse, indolore, de l'étendue de la main.

12 *avril*. — Temp. matin 38°,7; soir 38°,6. La tumeur s'étend encore; elle est aplatie, indurée au centre.

13 *avril*. — L'induration centrale s'accentue. Temp. matin 37°,9; soir 38°,0.

14 *avril*. — Temp. matin 37°,9; soir 37°,8. La tumeur de la première inoculation est effacée; celle de la seconde diminue.

15 *avril*. — Temp. matin 37°,6; soir 38°,0. La tumeur a le volume d'une noix.

21 *avril*. — Injection sous la peau, en arrière de l'épaule gauche, de 2 c. c. de culture récente de diphtérie. Temp. soir 39°,1. La tuméfaction commence.

22 *avril*. — Temp. soir 38°,8.

23 *avril*. — Temp. matin 39°,8; soir 39°,6.

24 *avril*. — Temp. matin 39°,8; soir 39°,7.

25 *avril.* — Temp. matin 39°,1; soir 39°,0.

26 *avril.* — Temp. matin 38°,5; soir 38°,3.

27 *avril.* — Temp. matin 37°,7; soir 38°,2. — L'animal est en parfaite santé; la tumeur passe par les phases ordinaires, elle disparaît le 30 *avril*, tandis que la précédente persiste encore.

2 *mai.* — Inoculation sous la peau de l'encolure, à droite, de 2 c. c. 1/2 de culture diphtérique récente. Temp. soir 38°,3.

3 *mai.* — Temp. matin 37°,9; soir 37°,7. La tumeur est formée, molle à la périphérie, dure au centre.

12 *mai.* — Tumeur très petite, persistante jusqu'au 30. La température reste normale.

13 *mai.* — Inoculation de 5 c. c. de culture récente de diphtérie sous la peau de l'encolure, à droite. Temp. matin 38°,6; soir 39°,5. Développement rapide de la tumeur. La respiration est accélérée et courte. Pulsations : 65 par minute.

14 *mai.* — Temp. matin 38°,7; soir 38°,8. Tumeur dure au centre, molle dans les parties déclives.

15 *mai.* — Temp. matin 38°,8; soir 38°,3. La tumeur s'indure au centre.

31 *mai.* — Inoculation de 12 c. c. de culture diphtérique, en arrière du coude gauche. Temp. matin 38°,2; soir 38°,8. Tuméfaction assez étendue.

1er *juin.* — Temp. matin 38°,5; soir 39°,3. Œdème très agrandi; le cheval se défend quand on l'approche.

2 *juin.* — Temp. matin 38°,7; soir 39°,2.

3 *juin.* — Temp. matin 38°,6; soir 38°,5. L'œdème diminue.

4 *juin.* — Temp. matin 38°,3; soir 38°,6. L'œdème diminue et est effacé le 6 juin.

14 *juin.* — Inoculation de 5 c. c. de culture pure, en cinq endroits différents, sur les côtés, à l'encolure, au poitrail. Temp. matin 37°,6; soir 39°,1.

15 *juin.* — Temp. matin 37°,9; soir 38°,3. A chaque piqûre, il se forme une tumeur plus petite que les précédentes.

16 *juin.* — Temp. matin 37°,9; soir 38°,2. Les tumeurs commencent à s'indurer.

20 *juin.* — Temp. matin 38°,0; soir 38°,3. Trois des tumeurs ont disparu, les autres sont très réduites.

25 *juin.* — Inoculation de 5 c. c. de culture diphtérique à l'encolure et en arrière de l'épaule droite. Temp. matin 38°,1; soir 38°,8. La tuméfaction commence le soir.

26 *juin.* — Temp. matin 38°,7; soir 38°,5. Les tumeurs augmentent.

27 *juin.* — Les tumeurs sont moins étendues et leur induration commence. Elles évoluent comme les précédentes, mais plus vite; leur disparition est plus rapide. Une tumeur, suite de l'inoculation du 10 avril, persiste encore sous forme d'un noyau très dur. Elle ne disparaît complètement que le 2 *juillet*.

7 *juillet.* — Inoculation de 5 c. c. de culture diphtérique récente, en avant de l'épaule droite. Temp. matin 38°,3; soir 39°,0.

8 *juillet.* — Temp. matin 38°,2; soir 39°,0. Tuméfaction moins rapide, moins étendue.

A partir du 10 *juillet*, la température est normale; le 13, la tumeur de la dernière inoculation a le volume d'une noisette; elle est dure et indolore.

13 *juillet*. — Inoculation de 5 c. c. de culture diphtérique récente, en deux piqûres en arrière des côtes. Temp. matin 38°,3; soir 39°,0.

14 *juillet*. — Temp. matin 38°,6. Les tumeurs sont moins saillantes, moins volumineuses que les précédentes.

15 *juillet*. — Température normale; les tumeurs se réduisent. Le 18, elles sont très dures.

27 *juillet*. — Inoculation sous-cutanée de 5 c. c. de culture récente. Mêmes effets que précédemment, mais moins marqués.

Du 3 avril au 1er août 1892, ce cheval a reçu sous la peau 50 c. c. de culture diphtérique très virulente en 11 injections. Chaque fois, il a éprouvé une tuméfaction locale sans que son état général soit sérieusement troublé. On le laisse reposer jusqu'au 20 octobre. A ce moment, on reprend les inoculations de culture récente et virulente sous la peau. Comme précédemment, il se produit, chaque fois, une tumeur tout aussi forte, mais la réaction fébrile est nulle ou insignifiante.

16 *novembre*. — Le cheval ayant reçu depuis le début de l'expérience 60 c. c. de culture, on le saigne pour éprouver le pouvoir immunisant de son sérum. A un cobaye de 400 grammes on injecte 4 c. c. de ce sérum, soit 1/100 de son poids; 24 heures après il est inoculé avec 1 c. c. de culture diphtérique récente très virulente, en même temps qu'un témoin. Celui-ci meurt en moins de 24 heures, le cobaye au sérum succombe neuf jours après. — A un autre cobaye du poids de 400 grammes, on inocule 1/4 de c. c. de la même culture diphtérique, âgée de 36 heures; puis, douze heures après, on lui injecte la quatre-vingtième partie de son poids de sérum (6 c. c.). Il a une escharre étendue au point d'inoculation, mais reste vivant. Un troisième cobaye reçoit sous la peau 1/10 c. c. de toxine diphtérique en même temps qu'un cobaye témoin. Puis, aussitôt, on injecte au premier cobaye 2 c. c. 1/2 de sérum, soit un peu plus du 1/200 de son poids. Le témoin meurt en 5 jours, le traité résiste; au bout d'un mois, il commence à maigrir et il succombe le 60e jour après le début de l'expérience.

Le pouvoir préventif et antitoxique du sérum de ce cheval était donc faible au mois de novembre 1892, malgré les nombreuses inoculations de bacilles vivants qu'on lui avait faites.

Celles-ci furent continuées du 16 novembre 1892 au 22 février 1893. Le cheval reçut ainsi 126 c. c. de culture en 13 injections. Chacune d'elles est suivie de la formation d'une tumeur dont le centre s'abcède, malgré toutes les précautions antiseptiques prises pour faire l'injection. Le pus ensemencé donne des cultures pures de bacille diphtérique virulent. Les abcès, une fois ouverts, se cicatrisent très vite. La réaction générale est au contraire moins prononcée, la température ne s'est élevée qu'une fois à 39°,0. Le reste du temps elle a été normale ou à très peu près.

En décembre 1892, le sérum est éprouvé. Injecté aux cobayes, 12 heures avant l'inoculation de 1 c. c. de culture diphtérique très virulente, il les préserve à la dose de 1/500 de leur poids; à la dose de 1/1000, il leur procure une survie de 7 à 10 jours sur les témoins.

Au mois de février 1893, le cheval est devenu très difficile à manier, il se défend énergiquement et ne peut être abordé sans danger. On se décide à le châtrer. L'opération, faite le 24 février, a les suites les plus simples. On laisse remettre l'animal et, au commencement de mars, on lui prend du sang. Le sérum injecté aux cobayes, 12 heures avant la culture, est préventif au 1/1000.

A partir du 15 mars 1893, pour éviter la production des abcès qui avaient rendu le cheval difficile à manier, on injecte les cultures dans la jugulaire, ce qui permet d'augmenter les doses.

15 *mars*. — Injection de 5 c. c. de culture dans la jugulaire : pas de réaction locale, ni générale.

10 *mars*. — Nouvelle injection de 10 c. c. de culture, aucun effet appréciable.

28 *mars*. — Injection dans la jugulaire droite de 23 c. c. de culture. Réaction fébrile passagère. Temp. le soir 38°,9.

11 *avril*. — Injection de 23 c. c. de culture dans la jugulaire droite. Un peu de liquide a sans doute pénétré dans la gaine de la veine : il y a un engorgement autour du vaisseau. La température dépasse 39°. Puis tout rentre dans l'ordre, l'engorgement disparaît peu à peu, il n'y a pas eu de phlébite.

24 *avril*. — Injection de 23 c. c. de culture récente dans la jugulaire gauche; petit engorgement péri-vasculaire. Réaction fébrile, temp. 39°, 0. Le 29 avril, l'engorgement a disparu.

1er *mai*. — Injection de 25 c. c. de culture dans la jugulaire droite. Pas d'engorgement. Température normale.

8 *mai*. — Injection de 25 c. c. de culture dans la jugulaire gauche. Pas de réaction.

15 *mai*. — Injection de 25 c. c. de culture dans la jugulaire droite. Pas de réaction.

19 *mai*. — Injection de 25 c. c. de culture dans la jugulaire droite et inoculation de 5 c. c. de culture sous la peau de l'épaule droite. Pas de réaction générale, réaction locale insignifiante.

En deux mois, du 15 mars au 20 mai, ce cheval a reçu près de 200 c. c de culture diphtérique, récente et très virulente, dans les veines. Le 22 juin, on éprouve son sérum : il est préventif au 1/1000e contre une dose de 1 c. c. de culture diphtérique âgée de 36 heures.

De temps en temps on lui injecte 25 c. c. de culture dans la jugulaire, sans qu'il en éprouve aucun effet.

Au mois de mars 1894, il a reçu près de 400 nouveaux c. c. de culture dans le sang. Le sérum a un pouvoir présentif de 10,000.

Dans le cours de deux années, plus de 800 c. c. de culture diphtérique très active ont été injectés dans les veines de ce cheval ou sous sa peau, cependant le pouvoir préventif de son sérum est relativement peu élevé. Pour l'augmenter, on introduit dans le sang de grandes doses de toxine diphtérique.

23 *mars* 1894. — La temp. du cheval à 2 heures de l'après-midi est de 38° 7 : on injecte dans la jugulaire 300 c. c. de toxine diphtérique qui tue

un cobaye de 500 grammes en 4 jours, à la dose de 1/10. de c. c. A 4 h., temp. 40°,5; à 8 h. temp. 40°,7. — Le 24 *mars*, temp. matin 38°,9, soir 38°,5. — Le 25 *mars*, temp. matin 38°,3, soir 38°,6. — A partir du 27 *mars*, la température ne dépasse pas 38°. Excepté le jour de l'injection, le cheval a toujours bien mangé.

Le 14 *avril*, on pratique une saignée. Pouvoir préventif du sérum, 50,000. Les cobayes qui n'en reçoivent que 1/100,000 de leur poids ont une survie de 6 jours sur les témoins.

Immédiatement après la saignée, la canule restant en place, on introduit 280 c. c. de toxine. L'injection n'est suivie d'aucun trouble général. Elle est faite à 9 h. du matin, la temp. étant 38°,0; à 11 h., temp. 39°,2; — à 2 h., temp. 39°,3 — à 6 h., temp. 39°,3. — Le 15 *avril*, temp. matin 38°,3; soir 38°,4.

Le 7 *mai*, nouvelle saignée. Le pouvoir préventif du sang est supérieur à 50,000, inférieur à 100,000. Les cobayes qui ont reçu 1/100,000 de leur poids de sérum et que l'on éprouve 24 h. après par inoculation de 1 c. c. de culture, âgée de 36 h., ont une survie de 15 jours sur les témoins qui ont succombé en moins de 30 heures.

Immédiatement après la saignée, à 10 h. du matin, la temp. du cheval étant de 38°,1, on injecte dans la jugulaire 350 c. c. de toxine. A 11 h., temp. 39°,0; à 2 h., temp. 39°,3; à 6 h., 39°,1. — Le 8 *mai*, temp. matin 38°,34; soir 38°,4.

Le 31 *mai*, nouvelle saignée. Le pouvoir préventif du sérum est compris entre 50,000 et 100,000.

Immédiatement après la saignée, injection dans la jugulaire de 250 c. c. de toxine, additionnée de 25 c. de culture diphtérique récente et très virulente. L'opération est faite à 4 h. du soir; temp. 37°,9; — à 7 h. 1/2, temp. 39°,0; — à 9 h. 1/2, 39°,8. — Le 1er *juin*, temp. matin 38°,6, soir 38°,2. Le 2 *juin*, temp. matin 38°,2. Le 2 *juin*, temp. matin 37°,4, soir 38°,0.

Le 26 *juin*, saignée. Le pouvoir présentif du sérum est toujours compris entre 50,000 et 100,000. Les cobayes qui reçoivent 1/100,000 de leur poids ont de longues survies, mais finissent par mourir. Le sérum mélangé à la toxine la neutralise à la dose de 1/40 de c. c. pour 1 c. c. de toxine.

Immédiatement après la saignée, injection dans la veine de 260 c. c. de toxine. 9 h. matin, temp. 38°,0; midi, 39°,4; 5 h., 39°,8. 27 *juin*, temp. matin 38°,0; soir 37°,9.

II. — Immunisation d'un cheval, par injection de toxine diphtérique. Cheval de 400 kilogrammes environ. Agé de sept ans.

La température du cheval prise matin et soir du 1er au 4 avril 1893 est en moyenne de 37°,0 le matin et de 37°,9 le soir.

Le 4 *avril*, il reçoit sous la peau de l'encolure 5 c. c. d'un mélange de 3 parties de toxine pour 2 de liqueur de Gram. Pas de réaction locale. Pendant les jours qui suivent, la température est plutôt basse : 36°,5 à 36°,7 le matin; 36°,7 à 37°,7, le soir.

8 *avril*. — Nouvelle injection semblable à la précédente. Le 9, le point d'injection est un peu douloureux, la température ne varie pas sensiblement, elle ne dépasse pas 38°,7 le soir.

16 *avril.* — La température est de 38°,1, le matin et le soir.

18 *avril.* — Injection de 10 c. c. d'un mélange : toxine 6, liqueur de Gram 4.

19 *avril.* — Œdème assez marqué qui devient dur et persiste jusqu'au 30. A partir du 21 avril, il y a une légère augmentation de la température sans que celle-ci dépasse 38°,7 le soir.

Le 27 *avril*, ce cheval étant en parfaite santé, reçoit 15 c. c. du mélange : toxine 12, liqueur de Gram 3.

28 *avril.* — Petit œdème dissipé dès le 30. Pas d'élévation de température. Le 1er *mai*, elle est même un peu au-dessous de la normale : 36°,9 le matin, 37°,5 le soir.

3 *mai.* — Injection de 15 c. c. du mélange : toxine 12, liqueur de Gram 3.

4 *mai.* — Œdème assez fort qui gagne les parties déclives, le 5 *mai* il a disparu. La température la plus haute a été 38°,0.

10 *juin.* — Injection de 10 c. c. d'un mélange : toxine 9, liqueur de Gram 1. Le soir œdème peu étendu, température 38°,3. Le 11, l'œdème a disparu. Température normale.

22 *juin.* — Injection de 12 c. c. de toxine pure; œdème local; le soir, température 38°,4. Le lendemain, l'œdème a disparu.

1er *juillet.* — Injection de 15 c. c. de toxine pure. Le soir, l'œdème mesure 25 centimètres de long, sur 15 de large. La température est de 38°,6. En deux jours, l'œdème a disparu.

12 *juillet.* — Injection en 3 endroits différents de 35 c. c. de toxine. Petit œdème à chaque piqûre. Température le soir 38°,7, le lendemain température normale.

18 *juillet.* — Injection sous cutanée de	30 c. c.	de toxine pure.	
29 *juillet.*	—	75 c. c.	—
7 *août.*	—	50 c. c.	—

La toxine injectée est très active, elle tue un cobaye de 500 grammes en 48-50 heures, à la dose de 1/10 de c. c. Après chacune de ces injections il y a eu de l'œdème local, sans élévation notable de température. Le cheval est gai et augmente de poids.

Le 18 *août*, on fait pénétrer lentement dans le tissu cellulaire, en arrière de l'épaule, 230 c. c. de toxine pure. Un œdème volumineux se produit qui met 4 jours à se dissiper. Le soir température 38°,8.

9 *août.* — Température le matin 38°,4; le soir 38°,0.

20 *août.* — Température le soir 37°,4.

30 *août.* — Nouvelle injection sous-cutanée de 200 c. c. de toxine pure. Œdème local qui dure trois jours. Pas d'élévation de température.

5 *septembre.* — Injection de	200 c. c.	sous la peau.	
27 —	—	200	—
3 *octobre.* —	—	200	—
10 *octobre.* —	—	300	—

L'état général est excellent; l'œdème qui a suivi chaque injection ne persiste pas plus de trois jours. Les oscillations de la température n'ont pas dépassé 0°, 8.

Du 4 avril au 10 octobre, ce cheval a donc reçu, sous la peau, près de deux litres de toxine diphtérique, dont 1,700 c. c. de toxine pure.

Le 4 *novembre*, on le saigne. Le sérum a un pouvoir préventif égal à 1,000. Immédiatement après la saignée, le cheval reçoit dans la jugulaire 450 c. c. de toxine pure. Il sue assez abondamment pendant quelques instants, il est un peu abattu pendant quelques heures, la température atteint 39°,0. Le lendemain il est rétabli.

25 *novembre*. — Nouvelle injection de 500 c. c. de toxine dans la jugulaire. Les choses se passent comme le 4 novembre.

12 *décembre*. — Injection dans la jugulaire de 600 c. c. de toxine. Sueurs, abattement et fièvre le soir (39°,1). Le lendemain, l'appétit est revenu.

27 *décembre*. — Saignée et injection de 500 c. c. de toxine, suivie des mêmes phénomènes que précédemment. Le pouvoir préventif du sérum a décuplé; sous l'influence de l'injection de 1,600 c. c. de toxine, il est de 10,000.

6 *janvier*. — Saignée et injection de 500 c. c. de toxine. Le pouvoir préventif est supérieur à 20,000, inférieur à 50,000. Les cobayes qui en reçoivent 1/50,000 de leur poids ont une survie de sept jours sur les témoins.

9 *février*. — Saignée et injection intra-veineuse de 200 c. c. de toxine. Aussitôt après l'injection, le cheval éprouve des crampes, il titube sur les pattes de derrière, comme s'il allait tomber. Au bout de quelques minutes, il reprend son aplomb, il sue abondamment, sa température monte à 39°,5 et il reste abattu pendant 24 heures.

22 *février*. — Saignée et injection de 400 c. c. de toxine. Un quart d'heure après l'injection, le cheval se couche pendant une dizaine de minutes; il est couvert de sueurs froides, le pouls est petit et tendu, la température s'élève à 39°,8. 24 heures après, il est vif et mange bien.

Le pouvoir préventif du sérum est compris entre 50,000 et 100,000.

20 *mars*. — Saignée et injection de 500 c. c. de toxine. L'animal éprouve quelques crampes, il a des sueurs, mais se rétablit en quelques instants. Cinq heures après l'injection, température 39°,0.

Le pouvoir préventif du sérum est supérieur à 50,000, les cobayes qui reçoivent 1/100,000 de leur poids ont une survie de quelques jours.

10 *avril*. — Nouvelle saignée et injection de 500 c. c. de toxine dans la jugulaire. Très légers malaises après l'opération.

1er *mai*. — Saignée et injection de 500 c. c. de toxine. Quelques crampes après l'opération. Le soir, bon appétit. Température 38°,7. Le pouvoir préventif du sérum est de 100,000.

7 *mai*. — Injection sous-cutanée de 5 c. c. de toxine. Le 8, le 9, le 10, le 14, le 16, le 21, le 22, le 24, le 26, le 29 et le 31 mai, injections sous-cutanées de 5 c. c. de toxine. A chaque injection, petit œdème dissipé en 24 heures. Santé parfaite.

5 *juin*. — Saignée et injection de 400 c. c. de toxine aussitôt; après quelques instants, il est remis. Le soir, il mange comme à l'ordinaire.

Le pouvoir préventif du sérum est un peu supérieur à 100,000.

La méthode des grandes injections intraveineuses de toxine diphtérique, à intervalles éloignés, nous paraît donner un sérum moins actif que celle des injections sous-cutanées fréquemment répétées.

III. Immunisation d'une vache bretonne, pleine. Observation de M. Nocard.

25 *février*. — On injecte sous la peu de la vache 20 c. c. de sérum de cheval dont le pouvoir préventif est voisin de 100,000. Temp. avant l'injection 38°, 8. — Le soir 39°, 7. — Le 26 février, température normale.

26 *février*. — La vache reçoit sous la peau 10 gouttes de toxine diphtérique très forte. L'injection est répétée, dans les mêmes condition jusqu'au 7 mars. Chaque fois il se produit un réaction locale, peu étendue, vite dissipée, la température reste normale.

7 *mars*. — La dose de toxine est portée à 13 gouttes : pas de réaction fébrile, toujours un petit gonflement au point d'injection. La dose de toxine est augmentée peu à peu, et on laisse parfois un jour d'intervalle entre deux injections. A chaque augmentation, il y a une ascension de température de 0°,5 à 1°.

20 *mars*. — On porte brusquement la dose de toxine de 20 gouttes à 30 gouttes, la température monte de 38°,5 à 40° c. Le lendemain elle est à 38°, 5. Jusqu'au 28 avril, jour de la parturition, la vache a absorbé 53 c. c. de toxine. Le 1er mai, les injections sont reprises : après chacune d'elles, il y a une élévation de température de 0°, 5 à 1°, puis la réaction devient moins forte, malgré que l'on injecte, à la fin jusqu'à 15 c. c. en une seule fois.

20 *juillet*. — La vache a reçu en tout 551 c. c. de toxine sous la peau, sa santé est restée parfaite. Elle fournit six litres de lait par jour.

Le pouvoir préventif de son sérum est de vingt mille.

TROIS CENTS CAS DE DIPHTÉRIE TRAITÉS PAR LE SÉRUM ANTIDIPHTÉRIQUE

PAR

M. E. ROUX

Chef de service à l'Institut Pasteur.

M. L. MARTIN ET M. A. CHAILLOU

Préparateur à l'Institut Pasteur. Interne des Hôpitaux. Interne des Hôpitaux.

Il nous a paru qu'un essai vraiment scientifique du nouveau traitement antidiphtérique ne pouvait pas être fait en confiant le sérum à différents médecins qui l'emploieraient suivant les circonstances. Nous avons pensé qu'il devait être appliqué d'abord, et pendant plusieurs mois consécutifs, dans un service d'hôpital qui reçoit beaucoup de malades présentant la diphtérie à tous les degrés d'intensité. Un service était tout désigné pour cette expérience en grand, c'est celui de la diphtérie à l'Hôpital des Enfants-Malades. Sa proximité de l'Institut Pasteur rendait notre tâche plus facile, et c'est dans ce même service que MM. Roux et Yersin ont fait leurs recherches, que MM. Martin et Chaillou ont étudié cliniquement et bactériologiquement plus de 400 cas de diphtérie. La façon dont la diphtérie se comporte à l'Hôpital des Enfants nous était donc familière, et par conséquent il nous était plus facile de saisir les modifications que le nouveau traitement allait apporter à la marche habituelle de la maladie. De plus, nous étions assurés de trouver bon accueil près des chefs du service; n'est-ce-pas, en effet, la bienveillance éclairée de M. Jules Simon, médecin de l'Hôpital des Enfants, qui a procuré à MM. Roux et Yersin, à MM. Martin et Chaillou les matériaux de leurs études? Cette fois encore, M. Jules Simon, M. Descroizilles, M. le professeur Grancher et M. Marfan nous ont montré le plus vif intérêt, ils ont mis leurs services à notre disposition, et les résultats que nous publions plus bas ont été acquis

sous leurs yeux. Nous leur exprimons ici toute notre reconnaissance. Nous adressons aussi nos remerciements à MM. les internes du service, MM. Pompidor, Zuber et Hallé, et à leurs collègues de l'hôpital MM. Damaye, Potel, Jorand, Morel, Bayeux, Magdeleine, Bureau et Rudeau ; non seulement ils ont suivi nos essais, mais, à maintes reprises, ils ont été pour nous des collaborateurs précieux.

Notre travail n'aurait pu être aussi facilement accompli sans le concours dévoué de Mme Daussoir-Kerleux, surveillante du pavillon. Elle nous a donné dans cette circonstance l'aide intelligente que depuis dix ans elle n'a jamais marchandé à ceux qui veulent étudier la diphtérie. Le personnel qu'elle dirige a secondé nos efforts avec le même esprit d'abnégation : que tous reçoivent nos remerciements.

C'est le 1er février 1894 que nous avons commencé à traiter les enfants diphtériques. A cette époque nous avions plusieurs chevaux bien immunisés : nous pouvions donc employer largement le sérum, nous étions sûrs de n'en pas manquer. Chaque jour, nous avons fait notre visite au pavillon et nous avons traité tous les enfants que nous y trouvions, quel que soit leur état. Il n'a été fait aucun choix, de sorte que les résultats bruts des mois de traitement peuvent être mis en regard de ceux que l'on avait avant : ils sont comparables. Rien n'a été changé aux soins donnés aux malades, le traitement local est resté le même (glycérine et acide salicylique, lavages à l'eau boriquée), le sérum est le seul élément nouveau introduit : c'est donc à lui qu'il faut attribuer les changements survenus.

La statistique du service de la diphtérie est établie pour les années antérieures avec un soin parfait par M. le directeur de l'hôpital et par Mme la surveillante : elle nous donnera tous les éléments nécessaires à une comparaison. Enfin, les expériences ont été faites du 1er février au 24 juillet, pendant les mois d'hiver où la diphtérie est fréquente et grave et pendant les mois d'été où elle est notablement plus rare. D'ailleurs il existe à Paris un autre hôpital d'enfants, avec un service de diphtériques : c'est l'hôpital Trousseau ; le sérum n'y a pas été employé, il sera pour nous un terme précieux de comparaison.

Avant d'entrer dans le détail du traitement et des observa-

tions, nous donnerons des chiffres bruts qui parleront tout de suite à l'esprit.

Pendant les années 1890, 1891, 1892 et 1893, 3,971 enfants sont entrés au pavillon de la diphtérie, ils ont fourni 2,029 décès. Le pourcentage de la mortalité totale est le suivant :

1890	55,88 0/0.
1891	52,45
1892	47,64
1893	48,47
Soit une moyenne de	51,71

Du 1er février au 24 juillet 1894, le traitement par le sérum a été appliqué. Sur 448 enfants entrés au pavillon, il y a eu 109 décès :

Soit........ 24,5 0/0.

Toutes les conditions étant restées les mêmes, la différence entre 51,71 0/0 et 24,5 0/0 mesure le bénéfice procuré par le traitement.

Pendant les mêmes mois de février, mars, avril, mai et juin 1894, il entrait à l'hôpital Trousseau 520 enfants qui n'ont pas reçu de sérum : il en est mort 316, soit une mortalité de 60 0/0.

On ne dira donc pas que l'épidémie pendant laquelle nous avons opéré était une épidémie bénigne.

Mais il convient de distinguer entre les angines et les croups trachéotomisés qui sont infiniment plus graves.

Statistique des angines à l'hôpital des Enfants-Malades :

Mortalité générale 1890	47,30 0/0.
1891	46,64
1892	38,80
1893	32,02
Soit une moyenne de	33,94 0/0.

Pendant les mois de traitement, de février à juillet 1894, la mortalité totale a été de 12 0/0.

Pendant le même temps à l'hôpital Trousseau elle a été, sans l'emploi du sérum, de 32 0/0.

Statistique des croups opérés à l'hôpital des Enfants-Malades :

Mortalité générale 1890	76,35 0/0.
1891	68,36 0/0.
1892	74,60
1893	73,45
Soit une moyenne de	73,19 0/0.

Pendant les mois de traitement, de février à juillet 1894, la mortalité totale a été de 49 0/0.

Pendant le même temps, à l'hôpital Trousseau, elle était, sans l'emploi du sérum, de 86 0/0.

Les chiffres ci-dessus sont absolument comparables entre eux; ce sont des nombres bruts qui ont leur éloquence, ils proclament la supériorité du traitement par le sérum antidiphtérique.

Tels que nous venons de les donner, ces chiffres ne tiennent pas compte du fait qu'au pavillon de la dipthérie entrent des enfants qui ne sont pas diphtériques. Ils ont bien des angines à fausses membranes et même parfois du croup, mais sans bacilles de Klebs-Löffler. Ces affections, déterminées par d'autres bactéries, sont bien moins dangereuses que la diphtérie vraie; leur mortalité est très peu élevée, puisque MM. Martin et Chaillou en ont observé 79 cas avec un seul décès, dans ce même pavillon de l'Hôpital des Enfants, et que M. Tezenas, à Lyon, en a décrit 146 cas avec trois décès. Ces fausses diphtéries ne sont pas rares; MM. Roux et Yersin ont signalé qu'un quart des enfants qui entrent au pavillon n'ont pas la diphérie; MM. Martin et Chaillou trouvent une proportion encore plus forte. Il convient donc de déduire tous ces cas, ils mettent au profit du sérum des succès qui ne lui sont pas dus. Dans une statistique rigoureuse ne doivent figurer que les angines et les laryngites reconnues diphtériques à l'examen bactériologique.

En conséquence, de nos 448 enfants traités, il faut en retrancher 128 qui n'avaient pas la diphtérie : il en reste 320, parmi lesquels 20 ont succombé dès leur entrée à l'hôpital; ils n'ont point reçu de sérum, ils ne peuvent être maintenus parmi les traités. En réalité, du 1er février au 24 juillet 1894, il est entré au pavillon seulement 300 enfants diphtériques, c'est sur ceux-là qu'il faut apprécier l'action du sérum.

Ces 300 enfants diphtériques, traités par le sérum, ont donné 78 décès; soit une mortalité de 26 0/0.

Les travaux antérieurs de MM. Roux et Yersin, de MM. Martin et Chaillou ont établi que, dans le même hôpital, la mortalité des enfants atteints de diphtérie, constatée par l'examen bactériologique, était environ de 50 0/0.

De la comparaison de ces chiffres rectifiés, ne comprenant

que des diphtéries authentiques, on peut conclure combien le sérum a sauvé d'existences.

La diphtérie est toujours grave à Paris; on peut se faire une idée de ce qu'elle était, pendant que nous avons appliqué le traitement, en se reportant à la mortalité fournie par l'hôpital Trousseau, à la même époque. L'inoculation, aux cobayes, des bacilles diphtériques isolés des fausses membranes a été faite 65 fois : elle a causé la mort des animaux en moins de 30 heures dans 60 cas, en 5 à 7 jours dans 3 cas, et n'a pas tué dans deux cas seulement.

Nous allons signaler maintenant tout ce qui nous a paru digne d'être relevé dans les observations de nos petits malades, pour permettre au lecteur d'apprécier les effets du sérum et de se faire une idée de la manière dont il a été administré.

Le sérum était fourni par des chevaux immunisés comme nous l'avons dit dans le mémoire précédent, son activité était comprise entre 50,000 et 100,000. C'est-à-dire qu'un cobaye qui en reçoit 1/50,000 de son poids supporte, 12 heures après, une dose de virus vivant ou de toxine, capable de tuer en moins de 30 heures des cobayes témoins. Ceux qui ne reçoivent que 1/100,000 de leur poids ont une survie de 6 à 15 jours. Un centimètre cube de toxine mélangé à 1/10 et même à 1/30 de centimètre cube de sérum devient tout à fait inoffensif pour les cobayes; injecté dans le tissu cellulaire, il ne donne pas d'œdème.

A tous les entrants, nous donnions systématiquement 20 c c. de sérum, en une seule piqûre, sous la peau du flanc. Si l'examen bactériologique établissait que le malade n'était pas diphtérique, l'injection n'était pas renouvelée. 128 enfants atteints d'angines diverses ont été ainsi traités sans le moindre inconvénient; il nous a même semblé que dans bien des cas leur angine était améliorée. Ils sont restés quelques jours dans le pavillon, exposés à la contagion sans être contaminés. C'est là une expérience qui démontre la valeur prophylactique du sérum.

Lorsque l'injection est bien faite, et dans le tissu souscutané, elle n'est pas douloureuse : en quelques instants le sérum est résorbé. Dans l'immense majorité des cas, il n'y a aucune réaction locale; si les précautions antiseptiques ont été négligées, il se produit une rougeur qui s'efface en 24-48 heures. Trois fois seulement nous avons eu un abcès qui a guéri rapide-

ment après avoir été incisé [1]. Chez les diphtériques, 24 heures après la première injection, nous en faisions encore une autre de 20 ou de 10 c. c., qui était en général suffisante pour conduire à bien la guérison. C'est le pouls et la température qui nous servaient de guide; si celle-ci se maintenait élevée, nous injections encore 20 ou 10 c. c. Le poids moyen des enfants traités est de 14 kilogr., de sorte que, dès la première injection, ils recevaient un peu plus du millième de leur poids de sérum. La quantité minima employée pour le traitement d'une diphtérie a été de 20 c. c., et la quantité maxima de 125 c. c. [2] Les enfants ont en général reçu plus du millième de leur poids de sérum, et dans quelques cas exceptionnels presque le centième. Pendant la convalescence, quelques jours après l'injection du sérum, il survient des éruptions, quelquefois mal définies, mais le plus souvent semblables à l'urticaire. Ces éruptions, qui ne s'accompagnent d'aucune fièvre, sont dues au sérum. A côté de celles-ci, il en est d'autres qui provoquent un mouvement fébrile; elles se remarquent surtout dans les diphtéries avec association; elles nous paraissent devoir être rangées parmi les érythèmes infectieux fréquents après les angines.

Les accidents consécutifs à la diphtérie sont beaucoup plus rares chez les traités par le sérum. Nous avons eu quelques paralysies du voile du palais, de peu de durée, un cas de paralysie d'un membre inférieur, et un autre de paralysie généralisée chez un enfant âgé de 9 ans, entré au 6e jour de la maladie avec angine, jetage et pâleur de la face. La paralysie est survenue trois semaines après la guérison, et l'enfant est mort en mangeant un biscuit; des parcelles ayant pénétré dans la trachée ont causé l'asphyxie. Trois enfants sont morts de syncope, l'un, moins de 24 heures, et l'autre moins de 26 heures après l'entrée; le dernier, qui avait eu la rougeole, a succombé 5 jours après le début du traitement.

Il convient maintenant d'envisager les modifications apportées par le sérum dans la marche de la maladie, en considérant sépa-

1. Un de ces enfants avait une association à streptocoques, à la suite de l'abcès il a eu de la pneumonie puis une arthrite qui a guéri après l'ouverture de l'articulation. — Chez un autre il y a eu abcès et gonflement articulaire passager.

2. Dans un cas vraiment exceptionnel nous avons injecté, en 30 jours, 205 c. c.: il en sera parlé plus loin.

rément les angines et les croups. Elles frapperont surtout le lecteur, s'il veut bien se reporter au tableau que MM. Chaillou et Martin ont donné de la diphtérie, dans leurs mémoires parus dans ces *Annales*[1].

I

ANGINES

Tous les travaux récents distinguent les angines diphtériques en angines pures et en angines avec associations. A proprement parler, les angines diphtériques ne sont jamais pures, car il y a toujours d'autres bactéries associées au bacille diphtérique dans les fausses membranes; cependant cette division bactériologique correspond à des types cliniques parfaitement distincts. Rappelons que l'on donne le nom d'angines pures à celles dont les fausses membranes, ensemencées sur sérum, donnent des colonies diphtériques, et peu ou même pas du tout de colonies de bactéries étrangères.

A. Angines pures. — 120 cas; morts, 9; mortalité 7,5 0/0. Ces 120 malades étaient atteints d'angine diphtérique à tous les degrés de gravité. L'ensemencement des fausses membranes a donné 47 fois des colonies très nombreuses, formées 45 fois par des bacilles longs ou moyens, 2 fois seulement par le bacille court; 28 fois les colonies étaient peu nombreuses et formées, 13 fois, par le bacille court; 55 fois les colonies étaient assez nombreuses avec bacilles moyens ou longs. Au point de vue bactériologique, 45, au moins, de ces angines s'annonçaient comme très graves.

Les enfants ont été amenés à des époques diverses de la maladie, souvent très difficiles à déterminer. Sur ce point les assertions des parents méritent bien peu de créance : ils vous affirment que leur enfant n'est malade que depuis la veille, et déjà les fausses membranes sont très étendues et l'état général déplorable. Souvent aussi, les médecins qui envoient les enfants à l'hôpital n'ont pas reconnu, au début, l'angine diphtérique : ils pensaient

1. Voir L. Martin. *Annales de l'Institut Pasteur*, mai 1892.
2. Voir L. Martin et Chaillou, *ibid.*, juillet 1894.

avoir affaire à une angine simple, et ils ne font dater la diphtérie que du moment où les fausses membranes sont devenues envahissantes et l'état général mauvais. Aussi n'essayerons-nous pas de classer les enfants d'après le jour de la maladie où le traitement a été entrepris.

Les quantités de sérum injectées ont varié entre 20 c. c. et 85 c. c.

État général. — L'état général des enfants traités par le sérum s'améliore très vite, à moins qu'ils ne soient venus à une période trop avancée de l'affection. On peut dire que l'aspect de la plupart des malades est tout à fait différent de ce qu'il était autrefois; on ne voit presque plus dans les salles de ces figures pâles et plombées; elles restent au contraire rosées, et l'attitude des enfants est plus vive et plus gaie. Les complications qui suivent la dipthérie sont aussi plus rares, nous en avons déjà parlé.

L'appétit revient vite et l'amaigrissement est peu prononcé. La durée du séjour à l'hôpital est notablement diminuée.

Fausses membranes. — L'effet du sérum sur la lésion locale est des plus manifestes : les fausses membranes cessent d'augmenter dans les 24 heures qui suivent la première injection, elles se détachent en général, après 36 à 48 heures, au plus tard le troisième jour. Dans 7 cas seulement, elles ont persisté plus longtemps; une fois elles n'ont cessé de se reproduire que le dixième jour. Le bacille diphtérique disparaît de la gorge en même temps que les fausses membranes, les ensemencements ont cessé de donner des colonies diphtériques (sauf quelques exceptions) du 3e au 5e jour. Dans les cas où les fausses membranes ont été tenaces, les ensemencements successifs donnaient des colonies de moins en moins nombreuses, mais formées de bacilles virulents. Les dernières prises de semence fournissaient surtout des colonies de coccus qui remplaçaient celles du bacille spécifique.

Ganglions. — Les ganglions cervicaux sont toujours engorgés, mais le tissu cellulaire n'est presque jamais empâté autour d'eux. Ils restent appréciables au toucher pendant longtemps.

Température. — La température s'abaisse promptement sous l'action du sérum. Dans les angines les moins graves, la chute se produit souvent dès le lendemain de la première injection; elle ne se fait guère attendre au delà du second jour. Cette défervescence est brusque, et sur les tracés elle est indiquée par

une ligne descendante, presque verticale, comme si la maladie avait été arrêtée tout d'un coup. Jamais, avant le traitement, nous n'avions observé de ces chutes soudaines de température, qui sont d'un excellent pronostic[1]. Une première injection de sérum ne suffit pas à abaisser la température des malades atteints d'angines graves : la défervescence ne commence qu'après la 2e ou 3e dose et se fait en lysis. Tant que la courbe de température n'est pas au-dessous de 38°, on ne peut pas considérer la guérison comme complète : il est prudent de la précipiter par des injections supplémentaires.

Pouls. — Le pouls bat environ 120 fois par minute dans les cas bénins, 140 fois et plus dans les cas graves. Le sérum agit sur le pouls plus tardivement que sur la température. Celle-ci a déjà baissé que le pouls reste fréquent encore pendant 2 ou 3 jours. Dans les angines sévères, à la suite des injections répétées de sérum, le nombre des pulsations diminue, mais seulement pour un temps, il remonte vers 120 et s'y maintient pendant quelques jours avant de tomber au chiffre habituel. Jamais le pouls ne redevient normal avant la température. Depuis l'usage du sérum, nous n'observons plus, pendant la convalescence, ces irrégularités du pouls qui étaient la règle autrefois.

Respiration. — Au début de l'angine diphtérique, le rythme respiratoire n'est guère modifié, excepté chez les très jeunes enfants, où il est accéléré. 56 de nos malades ont eu des troubles laryngés qui faisaient craindre le croup ; 31 avaient de la toux rauque, 25 avaient en outre la voix éteinte et du tirage. Beaucoup d'entre eux ont évité la trachéotomie grâce au sérum; mais c'est là un point important sur lequel nous reviendrons à propos des croups non opérés.

Albuminurie. — MM. Martin et Chaillou ont trouvé qu'un tiers seulement des enfants atteints d'angine diphtérique n'étaient pas albuminuriques, les deux tiers avaient de l'albuminurie précoce ou tardive. Sur 120 enfants traités par le sérum, 54 n'ont pas eu d'albuminurie, 12 ont été albuminuriques un seul jour; 54 avaient les urines albumineuses. La persistance et l'abondance de l'albumine a été notée seulement

1. Si l'angine diphtérique était reconnue dès son origine, et traitée aussitôt par le sérum, on éviterait même toute élévation de température au-dessus de 38°.

dans quelques cas les plus graves. Il est donc certain que le sérum empêche l'action de la toxine sur les reins et diminue considérablement l'albuminurie.

Complications. — 8 enfants ont eu de la diphtérie nasale, avec jetage. Ils étaient entrés tardivement, 2 sont morts.

La rougeole accompagnait l'angine diphtérique chez 8 malades : on sait combien cette association de la rougeole et de la diphtérie est regardée comme grave, cependant nous n'avons eu qu'un seul décès.

Un enfant, en dehors des 8 précédents, mérite d'être cité à part. Il était âgé de cinq ans; il a eu d'abord, chez ses parents, la rougeole, puis de la broncho-pneumonie, il est entré à l'hôpital avec la scarlatine accompagnée de dipthérie. Il a guéri, malgré toutes ces maladies superposées.

La diphtérie a été compliquée de scarlatine dans 5 cas : tous ont guéri.

Cinq fois, on a noté des éruptions polymorphes apparaissant à des moments variables, sans élévation de température : elles se sont effacées sans troubler la convalescence. Deux fois, après une éruption d'urticaire, il y a eu menace de suppuration des ganglions cervicaux.

Mortalité. — Les statistiques de MM. Martin et Chaillou permettent d'établir avec exactitude la mortalité des angines diphtériques pures; sur 96 enfants observés par eux en 1891 et 1892, il y a eu 38 décès, soit une mortalité de 41 0/0. Sur 120 angines diphtériques pures traitées par le sérum il y a eu 9 décès. Mortalité 7,5 0/0.

Parmi les 9 enfants qui ont succombé, 7 ont séjourné moins de 24 heures à l'hôpital, ils ne peuvent être comptés comme des insuccès pour la méthode, puisqu'ils n'ont vécu que quelques heures après l'injection; si nous les défalquons des chiffres précédents, nous obtenons les résultats suivants : 113 angines, 2 morts. Mortalité 1,7 0/0.

L'un de ces 2 malades, morts malgré le sérum, est le n° 43, entré au 4e jour de la maladie, avec teint plombé, jetage, épistaxis, hémorrhagies de la conjonctive et purpura. Il est resté 6 jours dans la salle, a reçu 70 c. c. de sérum, et s'est éteint après un abaissement de la température et une chute brusque de pouls de 170 à 80. A l'autopsie, on a trouvé de la péritonite

tuberculeuse, de la dégénérescence amyloïde des reins et du foie, un mal de Pott avec abcès dans la gaine du psoas gauche. Les poumons étaient sains.

L'autre enfant (n° 197) avait une angine bénigne; le 2e jour de son entrée, la rougeole s'est déclarée, sa température s'est maintenue entre 39° et 40°. Le 8e jour, il s'est formé un abcès du cou avec sphacèle. L'enfant mourut avec des saignements de nez, de la diarrhée sanguinolente et de la broncho-pneumonie.

De tout ce qui précède, nous croyons que l'on peut conclure que toute angine diphtérique pure guérira si elle est traitée, à temps, par le sérum.

B. Angines diphtériques à associations. — Les angines diphtériques sont dites à associations, lorsque l'ensemencement des fausses membranes sur sérum donne, avec les colonies du bacille spécifique, des colonies assez nombreuses d'autres bactéries. Toutes ces associations ne sont pas également graves; nous distinguerons : 1° les associations avec un petit coccus, assez fréquent dans les angines, que nous désignons sous le nom de coccus de Brisou, parce qu'il a été fourni d'abord à MM. Roux et Yersin, puis à M. Martin par un enfant du nom de Brisou; 2° les associations avec les staphylocoques pyogènes; 3° les associations avec les streptocoques. Ces trois divisions correspondent à des types cliniques bien tranchés.

1° *Association avec le petit coccus.* — 9 cas, pas de décès. Les associations de ce coccus avec la diphtérie sont toujours bénignes : le sérum n'a fait que hâter la guérison, il a été injecté à la dose de 20 . c. à 40 c. c.; une seule fois on en a donné 60 c. c.; 6 fois les petits malades avaient de la toux rauque avec du tirage, car les angines où se trouve ce petit coccus ont une tendance à s'étendre au larynx.

L'albuminurie n'a existé que 2 fois. Comme complications notons une rougeole, survenue le 16e jour du séjour à l'hôpital, et 2 éruptions scarlatiniformes, sans fièvre, apparues pendant la convalescence.

2° *Association avec les staphylocoques pyogènes.*—Ces angines sont plus graves que les précédentes. Nous en avons observé 5, toutes ont guéri. Leur durée est plus longue que celle des angines pures, les quantités de sérum employées ont varié de 30 c. c. à 50 c. c.

La température est toujours élevée; 3 fois elle dépassait 39,5; le sérum a amené une chute rapide. Le nombre des pulsations, d'abord très augmenté, revient assez vite au chiffre ordinaire.

Quand il y a des staphylocoques dans les fausses membranes diphtériques, les troubles respiratoires sont fréquents, avec tendance à la broncho-pneumonie; chez nos malades, ils ont disparu rapidement. 3 enfants ont eu de la toux rauque, 2 du tirage. L'albuminurie a été notée dans 4 cas sur 5.

Comme complications, citons une scarlatine concomitante à la diphtérie; une rhinite rebelle qui durait depuis un mois lorsque l'enfant est entré dans les salles.

3° *Association avec les streptocoques.* — De toutes, ce sont les plus graves. MM. Martin et Chaillou en ont étudié 24 cas qui leur ont donné 21 morts, soit 87 0/0. Nous en avons traité 35 par le sérum, 12 ont succombé, soit une mortalité de 34,2 0/0. Quatre enfants sont morts moins de 24 heures après leur entrée; si on les retranche, il reste 31 cas avec 8 morts, soit 25,8 0/0. Dans ces diphtéries compliquées par les streptocoques il faut donner davantage de sérum, surtout au début, et prolonger les injections; les quantités employées ont varié de 20 c. c. à 75 c. c.

La durée de la maladie est plus longue, les enfants qui guérissent restent au moins 15 jours à l'hôpital. Avec l'emploi du sérum, les symptômes généraux, toujours si graves dans ces formes, ont été notablement atténués, la pâleur de la face était moins fréquente et moins prononcée.

Les fausses membranes, constamment abondantes et grisâtres, se détachent plus facilement, les ganglions, presque toujours gros, cessent d'augmenter de volume si les injections sont suffisantes; 9 fois ils étaient empâtés et énormes.

La température est élevée : 26 fois au-dessus de 39°, 9 fois au-dessus de 38°. Le sérum n'amène pas ici de ces chutes brusques que nous signalions dans les angines pures : les défervescences rapides sont très rares (3 fois). Lorsque la guérison survient, la décroissance de la température se fait en lysis.

Le pouls bat entre 120 et 140 fois à la minute; 4 fois seulement le nombre des pulsations était inférieur à 120. Dans les deux premiers jours du traitement, si la maladie doit se terminer favorablement, le pouls tombe à 120 et se maintient à cette fréquence pendant assez longtemps.

L'albuminurie était notable chez 18 malades, elle manquait chez 7 autres, et n'a pu être constatée chez 10 enfants trop jeunes pour qu'on ait recueilli de leurs urines.

La respiration a été fréquente dans 7 cas (au-dessus de 40) et 2 fois, où elle dépassait 50 à la minute, on a craint de la broncho-pneumonie.

Parmi les complications nous devons signaler : anasarque 1 fois; jetage 5 fois; adénite suppurée 2 fois; conjonctivite 2 fois, éruptions polymorphes 4 fois; rougeole 7 fois; scarlatine 2 fois.

L'autopsie de 10 des enfants qui ont succombé a pu être faite; elle a montré : 4 fois de la broncho-pneumonie; 1 fois de la bronchite pseudo-membraneuse; 1 fois des suppurations multiples, suite de scarlatine; 1 fois une infection généralisée avec streptocoques dans la rate; 2 fois l'angine infectieuse a amené la mort en moins de 24 heures; 1 fois elle a déterminé la mort subite.

En résumé : sur 169 angines diphtériques, traitées par le sérum, la mortalité a été de 21; soit 12,4 0/0.

Angines dipthériques pures. . . .	120	Morts 9	mortalité 7.5 0/0.
Déduction de 7 enfants ayant séjourné moins de 24 heures à l'hôpital.	113	Morts 2	mortalité 1.7 0/0.
Angines avec associations. . .	49	Morts 12	mortalité 24.2 0/0.
Déduction de 4 enfants ayant séjourné moins de 24 heures à l'hôpital.	45	Morts 8	mortalité 17.7 0/0.
Associations avec le petit coccus.	9	Morts 0	
Associations avec les staphylocoques	5	Morts 0	
Associations avec les streptocoques	35	Morts 12	mortalité 34. 2 0/0.
Déduction faite de 4 enfants ayant séjourné moins de 24 heures à l'hôpital. . . .	31	Morts 8	mortalité 25. 8 0/0.

II

CROUPS

Nous les distinguons en Croups opérés et Croups non opérés.

1° **Croups non opérés.** — Des enfants sont parfois conduits au service de la diphtérie, parce qu'ils ont la toux rauque, la voix éteinte et même du tirage; point de fausse membrane dans la gorge; cependant, leur mucus pharyngien, ensemencé sur

sérum, donne de nombreuses colonies du bacille de Klebs-Löffler. Ces enfants ont un croup diphtérique d'emblée. Leurs troubles laryngés peuvent ne pas s'aggraver et ils échappent à la trachéotomie.

10 enfants rentrent dans cette catégorie, un seul est mort.

L'ensemencement du mucus pharyngien a donné 4 fois du bacille diphtérique pur, 3 fois du bacille diphtérique et du petit coccus, 3 fois du bacille diphtérique et des streptocoques. L'enfant qui a succombé était parmi ces derniers, il venait d'avoir la rougeole, et il est mort avec de la broncho-pneumonie et une pleurésie purulente à streptocoques. 2 autres enfants de ce groupe sont les seuls qui aient eu de l'albumine.

Il n'y a rien à dire de particulier sur les croups non opérés, si ce n'est qu'ils guérissent facilement avec le sérum, qui, donné à dose suffisante, arrête les troubles laryngés, d'ordinaire en moins de 3 jours. Plusieurs de ces enfants ont rejeté des fausses membranes considérables. La dose moyenne de sérum employée a été de 35 c.c.

2° **Croups opérés.** — 121 cas, 56 décès, mortalité 46 0/0. Les statistiques antérieures de M. Martin et de MM. Martin et Chaillou établies, dans le même service, sur des croups reconnus diphtériques à l'examen bactériologique, donnent une mortalité de 68 0/0 et de 67 0/0.

Pour l'étude il faut distinguer les croups diphtériques purs, des croups à associations. Leur gravité est bien différente.

Croups opérés diphtériques purs. — 49 cas, 15 décès, mortalité 30,9 0/0.

40 fois, l'ensemencement a donné de très-nombreuses colonies, 9 fois des colonies peu abondantes; elles étaient formées par des bacilles longs, excepté dans 2 cas, où ils appartenaient à la variété courte. La presque totalité de ces malades étaient gravement atteints, aussi tous les symptômes que nous avons décrits dans les angines se retrouvent-ils ici aggravés. La quantité de sérum nécessaire au traitement est naturellement plus forte : nous en avons injecté 60 c. c. en moyenne; 1 fois nous avons été jusqu'à 205 c.c. chez un enfant du poids de 15 kilogrammes, pris de rougeole après sa diphtérie, et qui, véritablement, a lutté avec ténacité pendant 30 jours contre la mort.

Les bacilles diphtériques persistent plus longtemps dans la trachée que dans la bouche; on en trouve dans les mucosités trachéales, chez les enfants qui succombent, même après plusieurs jours de traitement, surtout au niveau de l'ulcération que produit trop souvent le frottement du bec de la canule.

La température est presque toujours au-dessus de 39° après l'opération (45 fois) et les injections de sérum produisent rarement une chute brusque (4 fois), mais une descente en lysis avec des irrégularités.

Le pouls reste au-dessus de 140 dans quelques cas (8 fois) et le plus souvent entre 120 et 140. Il ne revient à la normale que beaucoup après la température.

La respiration est surtout importante à observer, car, après la trachéotomie, les complications pulmonaires ne sont malheureusement pas rares. Quand les mouvements respiratoires dépassent 50 par minute, la situation devient très grave; 11 malades ont atteint ce chiffre, 8 sont morts.

Il est de règle que l'albuminurie soit notable et prolongée.

Un avantage du traitement par le sérum, c'est qu'il fait détacher promptement les fausses membranes trachéales. Celles-ci sont rejetées plus facilement, et quelquefois par grands lambeaux. La trachée et le larynx devenant libres beaucoup plus tôt, on peut enlever la canule après peu de jours; souvent nous l'avons supprimée le troisième jour. Il ne faut pas hésiter à tenter l'enlèvement précoce du tube, quitte à le remettre si l'enfant ne peut s'en passer. Pour nous, depuis l'usage du sérum, enlever la canule aussitôt que possible est une règle : on ferme ainsi une porte ouverte à l'infection pulmonaire.

Parmi les complications nous avons eu : 3 scarlatines; 8 rougeoles souvent prises dans le service, car elles se déclarent du 14e au 16e jour après l'entrée dans les salles; un des enfants a eu la scarlatine d'abord, la rougeole ensuite, il a guéri. Nous avons noté 11 éruptions polymorphes.

Les 15 décès que nous avons signalés sont dus : 4 à des diphtéries toxiques (24 heures et 26 heures après l'entrée dans les salles); 2 à la bronchite pseudo-membraneuse, contre laquelle le sérum restera impuissant, car il ne peut empêcher les fausses membranes d'obturer les bronches; 2 décès ont été causés par les suites opératoires, syncope pendant l'opération et hémor-

rhagie post-opératoire. La tuberculose a été rencontrée deux fois (adénopathie trachéobronchique et méningite). Une mort est survenue à la suite d'une scarlatine; une autre après une rougeole, alors que la diphtérie était guérie. Un abcès développé au-devant de la trachée a été suivi, chez un enfant, de médiastinite suppurée. Enfin, une bronchite capillaire a emporté un de nos malades et la gangrène pulmonaire en a fait périr un autre.

Si nous retranchons les 4 cas où la mort est survenue moins de 24 heures après le début du traitement, il nous reste pour les croups diphtériques purs opérés 45 cas avec 11 morts, soit 24,4 0/0.

Croups diphtériques opérés à associations. — Dans les croups nous reconnaîtrons les mêmes associations que dans les angines.

1° *Association avec le petit coccus.* — 9 cas, 1 mort.

Nous avons vu pour les angines que l'association du bacille diphtérique avec le petit coccus était bénigne : il en est de même encore pour les croups. Le seul décès que nous enregistrons sur 9 cas est dû à une broncho-pneumonie consécutive à la trachéotomie et jointe à une diarrhée verte.

La durée de la maladie est assez longue (15 à 18 jours). La température et le pouls sont souvent très élevés au début ; température au-dessus de 39°; pouls, 140 à 160; mais, sous l'influence du sérum, la défervescence se fait d'ordinaire en lysis et le pouls se rapproche de la normale. La quantité de sérum employée a été en moyenne un peu supérieure à 50 c. c.

Complications, 2 rougeoles, 1 adénite suppurée.

2° *Association à staphylocoques.* — 11 cas, 7 morts, mortalité 63 0/0.

L'association des staphylocoques au bacille diphtérique ne nous a pas donné de morts dans les cas d'angine, elle se montre très meurtrière dans les cas de croup, à cause des complications pulmonaires qu'elle cause et contre lesquelles le sérum est impuissant.

Les fausses membranes sont étendues et pultacées, les ganglions gros, la température élevée toujours au-dessus de 39°, le pouls bat plus de 40 fois par minute. La respiration est surtout à surveiller : dans tous les cas mortels, sauf dans un cas, elle dépassait 60 à la minute, manifestant ainsi l'invasion du

poumon. L'albuminurie n'a manqué qu'une fois, chez un enfant qui a succombé le lendemain de son arrivée.

La quantité de sérum employée a été en moyenne de 60 c. c.

Comme complications, relevons 3 rougeoles. Les décès ont été causés 3 fois par la bronchite pseudo-membraneuse; 4 fois par la broncho-pneumonie. En outre, 2 de ces enfants étaient tuberculeux.

Si nous faisons la correction des chiffres en retranchant 3 enfants, morts moins de 24 heures après leur entrée, nous avons : 8 cas, 4 morts, soit 50 0/0.

3° *Association à streptocoques.* — 52 cas, morts 33, mortalité 63 0/0.

Ces associations à streptocoques sont les plus redoutables de toutes. L'expérience nous a montré que les lapins inoculés dans la trachée, avec un mélange de diphtérie et de streptocoques, mouraient, malgré le sérum, à moins que celui-ci ne soit injecté à hautes doses et peu de temps après l'inoculation. On voit combien la clinique est d'accord avec l'expérimentation.

L'ensemencement sur sérum fournit un premier élément de pronostic; moins les colonies diphtériques sont nombreuses, plus la maladie sera bénigne. Elle dure toujours longtemps (plus de 20 jours en moyenne), même quand l'issue est favorable. La quantité de sérum employée est considérable, elle a varié entre 70 c. c. et 100 c. c. Car, dans ces croups associés, la température (au-dessus de 39°) et le pouls (140 à 160) reviennent plus lentement à la normale. Tous nos malades respiraient plus de 35 fois par minute, ceux qui ont succombé avaient 70 inspirations et davantage encore. L'albuminurie n'a manqué que 2 fois. 8 fois il y a eu des éruptions mal définies.

A la maladie déjà si grave par elle-même, sont venues s'ajouter la rougeole (4 fois) et la scarlatine (3 fois).

La bronchite pseudo-membraneuse est particulièrement fréquente dans les croups diphtériques associés, surtout chez les enfants un peu âgés. Sur nos 300 malades, nous n'avons observé que 8 cas de bronchite pseudo-membraneuse : 3 appartiennent au groupe des croups diphtériques à streptocoques, 3 à celui des croups diphtériques à staphylocoques. Tous les autres décès sont dus à la broncho-pneumonie. Sur les coupes des

poumons, on voit en abondance des bacilles diphtériques et des streptocoques.

La gravité extrême de ces croups est encore affirmée par ce fait que 7 enfants ont succombé moins de 24 heures après leur entrée à l'hôpital. Si nous les déduisons des chiffres que nous avons donnés, il reste 45 cas de croups diphtériques associés aux streptocoques et opérés, avec 26 morts, soit une mortalité de 57 0/0.

Malgré ce chiffre élevé, le bénéfice de l'intervention du sérum est manifeste ; car MM. Chaillou et Martin ont constaté, avant le traitement, une mortalité de 80 0/0.

Un certain nombre d'enfants, ayant des croups non diphtériques, ont été trachéotomisés ; bien entendu, ils ne font pas partie des 300 cas dont nous venons de donner le détail. Comme tous les entrants au pavillon, ils ont reçu une injection de 20 c. c. de sérum, aucun d'eux n'a pris la diphtérie. Auparavant, la contamination de ces croups n'était pas rare : MM. Chaillou et Martin en ont rapporté des exemples.

Chez les enfants tuberculeux, la diphtérie donne un coup de fouet à la tuberculose. La convalescence paraît bien s'établir à la suite des injections de sérum, puis l'état général devient mauvais, la température s'élève chaque soir et, après une lutte plus ou moins prolongée, les enfants succombent.

En résumé, sur 121 croups opérés, 56 décès, soit une mortalité totale de 46 0/0[1].

Déduction faite des 14 enfants morts moins de 24 heures après leur entrée, nous avons 107 opérés, 42 morts, mortalité 39,2 0/0.

Croups diphtériques purs..................	49	Morts 15	Mortalité 30.9 0/0
Déduction faite de 4 enfants morts moins de 24 heures après leur entrée, restent....	45	— 11	— 24.4 0/0
Croups dipthériques avec le petit coccus..	9	— 1	— 11.0 0/0
Croups diphtériques avec staphylocoque..	11	— 7	— 63.0 0/0
Déduction de 3 enfants morts moins de 24 heures après leur entrée, restent....	8	— 4	— 50.0 0/0

1. Voici la statistique la plus importante publiée en Allemagne par les collaborateurs de M. Behring, l'inventeur de la sérum-thérapie.

Statistique de MM. Ehrlich, Kossel et Wassermann.

Traités 220. Guéris 168. Morts 52. Mortalité 23,6 0/0.

Parmi ces 220 malades, 67 furent trachéotomisés, ils ont fourni 30 morts, soit une mortalité de 44,9 0/0.

Dans une autre publication, MM. Ehrlich et Kossel en font connaître 55 traités nouveaux, dont 25 trachéotomisés, avec 8 morts seulement, tous parmi les opérés. On ne dit pas si l'examen bactériologique a été fait dans tous les cas.

Croups diphtériques avec streptocoque....	52	Morts	33	Mortalité	63.0 0/0
Déduction de 7 enfants morts moins de 24 heures après leur entrée, reste......	47	—	26	—	57.7 0/0

Neuf des enfants, ayant subi la trachéotomie, étaient âgés de deux ans ou de moins de deux ans; quatre ont guéri, dont un enfant de 9 mois et un de 4 mois.

Parmi les croups diphtériques associés aux streptocoques et opérés, 12 cas méritent une mention spéciale. Il s'agit d'enfants, entrés pour des croups diphtériques purs, et contaminés dans les salles. Avant la trachéotomie et immédiatement après, les ensemencements sur sérum ne donnent que des colonies diphtériques. Dès les premières injections les enfants paraissaient devoir guérir, lorsque, brusquement, leur état devient mauvais, la température augmente, le pouls et la respiration deviennent fréquents, l'infection est accomplie. L'ensemencement montre, à côté des colonies du bacille de Klebs-Löffler, de nombreuses colonies de streptocoques. Sur ces 12 enfants, 11 ont succombé à la broncho-pneumonie, annoncée tout d'abord par l'accélération des mouvements respiratoires.

L'histoire de ces contagions est instructive. Il faut d'abord savoir, qu'au pavillon, les enfants trachéotomisés sont dans les salles communes. A la fin de janvier 1894, un si grand nombre de cas de broncho-pneumonie s'était produit chez les opérés, qu'il fut procédé à une désinfection; de sorte qu'au moment où nous avons commencé le traitement (1er février 1894) les conditions hygiéniques étaient relativement favorables. Aussi la mortalité des croups opérés a été de deux sur douze dans ce premier mois. Mais, le 23 février, un enfant (n° 23) est admis, qui a du croup diphtérique avec streptocoques associés. Il contamine le n° 24 qui contamine le n° 25. Les trachéotomies étant alors peu nombreuses, on pratique un isolement relatif, en séparant les opérés par des enfants atteints d'angines bénignes. Il y eut un arrêt dans la contagion de la broncho-pneumonie. Mais, dans le courant de mars. il entre successivement trois enfants ayant des croups non diphtériques causés par des streptocoques, et atteints aussi de broncho-pneumonie. Le pavillon était encombré de malades, aucun isolement n'était possible : nous voyons, successivement, huit enfants opérés prendre la broncho-pneumonie. Devant un pareil désastre, pour opposer quelqu'obstacle à l'in-

fection du poumon, nous avons commencé à injecter, immédiatement après la trachéotomie, 2 à 4 c. c. d'huile d'amandes douces contenant 5 grammes de menthol et 1 gramme de gaïacol pour 100 [1]. Au moyen d'un petit tube de caoutchouc, qui passe dans la canule interne, on fait tomber l'huile dans la trachée. Cette petite manipulation, très simple, était renouvelée chaque jour, tant que la canule restait en place. Elle provoquait un peu d'expectoration immédiate, et pendant plusieurs heures l'haleine de l'enfant sentait le menthol. Cette pratique a certainement évité la broncho-pneumonie à plusieurs de nos opérés, elle a contribué à guérir quelques-uns qui étaient déjà atteints, et prolongé quelques autres au delà de tout espoir. Après une désinfection du pavillon, faite en avril, la broncho-pneumonie a disparu jusqu'en juin, où un enfant arrivé avec croup diphtérique, associé aux streptocoques, a contaminé deux autres qui avaient des croups diphtériques purs; tous trois sont morts de broncho-pneumonie. Tout cela prouve jusqu'à l'évidence qu'il faut isoler les angines et les croups à association. L'huile mentholée n'est qu'un palliatif; on ne doit jamais introduire un malade atteint de broncho-pneumonie dans une salle où il y a des enfants trachéotomisés.

Quand nous avons parlé des croups diphtériques, sans angine et non opérés, nous avons fait remarquer que les injections de sérum, en arrêtant la production des membranes et en faisant détacher celles qui étaient formées, avaient évité la trachéotomie à plusieurs de ces enfants. C'est là un point qui nous paraît tout à fait digne d'attention. Sur les 169 enfants, entrés dans le service pour angines diphtériques, 56 présentaient des troubles laryngés; 31 avaient la toux rauque, 25 la voix éteinte et un tirage marqué, si bien que l'on pouvait croire que ces derniers seraient opérés. Sous l'influence du sérum (et dans ces cas il ne faut pas craindre de faire une injection toutes les 12 heures), le tirage diminuait, puis ne revenait que par accès, l'enfant rejetait des fausses-membranes, et au bout de 2 à 3 jours la respiration était normale, au grand étonnement de MM. les Internes et du Personnel du pavillon, qui, avec leur grande habitude des

1. Quelques fois, nous avons enduit la paroi interne de la canule, avec un collodion dans lequel on avait dissous du menthol et du gaïacol. L'air entrant dans les poumons y apportait des vapeurs antiseptiques.

enfants atteints de croup, pensaient bien que l'opération ne serait pas évitée. Cela est tout à fait d'accord avec ce que nous avons dit du prompt détachement des fausses-membranes, dans les angines traitées avec le sérum. Aujourd'hui, en présence d'un enfant qui a du tirage, il ne faut pas se presser d'opérer, il faut injecter du sérum et attendre autant que possible. Il est facile de montrer que, depuis l'usage du sérum, le nombre des trachéotomies a diminué au pavillon. Les relevés de MM. Martin et Chaillou montrent, qu'en 1891 et 1892, sur cent enfants atteints de diphtérie entrés dans le service, 50 au moins sont trachéotomisés, tandis que sur les 300 enfants traités par le sérum, 121, soit seulement 40 0/0, ont subi l'opération. Il faut encore remarquer que 102 ont été opérés avant l'injection du sérum ou dans les 12 heures qui ont suivi la première injection ; 14 entre la 12e et la 36e heure après le début du traitement, et 5 seulement ont été trachéotomisés plus de 36 heures après qu'ils ont reçu l'antitoxine. A combien d'enfants n'éviterait-on pas la trachéotomie si le sérum était administré plus tôt? Nous dirons même, qu'avec le sérum, la trachéotomie doit être, dans la grande majorité des cas, remplacée par le tubage. En effet, il ne s'agit plus maintenant de laisser un tube à demeure, dans le larynx, pendant des journées ; il suffira, le plus souvent, de le maintenir en place, pendant un jour, deux au plus, pour prévenir l'asphyxie imminente et gagner du temps jusqu'à ce que les fausses membranes se détachent. Notre conviction à ce sujet est si forte que nous espérons bientôt montrer, par des faits, que le tubage est le complément de la sérum-thérapie. Dans l'avenir la trachéotomie sera l'exception, au grand bénéfice des enfants.

Quel est le traitement local à recommander pour venir en aide au sérum? Nous proscrivons d'une façon absolue tous les badigeonnages avec des substances caustiques ou toxiques. On se contentera de faire deux ou trois lavages par jour avec de l'eau boriquée, ou mieux avec de l'eau additionnée de 50 grammes de liqueur de Labarraque par litre. Pas d'acide phénique, pas de sublimé, nous préférons l'eau bouillie aux liquides antiseptiques qui ne peuvent être avalés par l'enfant sans danger. Il y a bien assez de la toxine diphtérique dans le corps : n'en introduisons pas d'autres.

Le lecteur de ce travail aura sans doute été frappé du grand nombre des complications signalées chez nos enfants diphté-

riques[1]. Il a été si souvent question ici de rougeole, de scarlatine, de broncho-pneumonie, qu'il a pu légitimement croire que nous opérions, non pas dans un service spécial aux diphtériques, mais bien dans des salles communes à toutes les maladies contagieuses. Il est malheureusement vrai que notre pavillon de diphtérie est un peu le rendez-vous de toutes les affections de l'enfant, et ce n'est pas là, on l'avouera, une condition pour favoriser le traitement. Malgré tout, les résultats que nous avons obtenus sont si différents de ceux qu'on avait auparavant que la meilleure façon de conclure est de les mettre encore une fois sous les yeux du lecteur :

300 enfants atteints de diphtérie certaine, et traités par le sérum antidiphtérique, ont donné une mortalité de 26 0/0, au lieu de 50 0/0 qui était la mortalité ordinaire.

Peut-on avoir mieux encore ? Nous sommes convaincus que cela est possible. Mais cette amélioration nouvelle, aucun médicament ne la donnera, elle sera la conséquence d'une meilleure organisation des services. Nous craignons beaucoup qu'on ne mette plus de temps à la réaliser qu'on n'en a mis à découvrir la sérumthérapie[2].

1. 33 rougeoles, 13 scarlatines, 6 tuberculoses, 3 coqueluches, 3 varicelles, 39 broncho-pneumonies. — Les 33 diphtériques qui ont eu la rougeole ont fourni 6 morts ; sur 15 d'entre eux, trachéotomisés, 4 ont eu la rougeole en même temps que la diphtérie (2 morts), 11 après l'ablation de la canule (1 mort).

2. Je croirais manquer à mon devoir en ne signalant pas ici la mauvaise organisation des Services de diphtérie à Paris. Grâce à un déplorable système de roulement, le pavillon de la diphtérie change de médecin tous les trois mois, les divers Chefs de service de l'hôpital en sont titulaires à tour de rôle. Pour être bien conduit, un service de diphtérie doit rester entre les mains du même médecin, qui a l'obligation de se faire une spécialité de l'étude de cette maladie : il aura sous ses ordres des aides et un personnel fixes qui seront ses véritables collaborateurs.

L'organisation matérielle ne correspond en rien à ce qu'exige l'hygiène la plus élémentaire. A l'Hôpital des Enfants, il y a une salle de garçons et une salle de filles, avec un cabinet d'isolement à une des extrémités. On est obligé de garder les rougeoleux, les scarlatineux dans les salles communes. La broncho-pneumonie, si redoutable pour les opérés, y règne presque en permanence, malgré les efforts des chefs, des internes et du personnel. Le Directeur de l'hôpital apporte la meilleure volonté à faire opérer la désinfection, mais il suffit de l'entrée d'un enfant contaminé pour tout souiller à nouveau. C'est surtout en hiver, quand le pavillon est rempli, que les fenêtres restent closes, que la broncho-pneumonie devient terrible. Il faut, de toute nécessité, isoler non seulement les diphtéries accompagnées de rougeole et de scarlatine, mais les angines et les croups à association. D'ailleurs, un pavillon de diphtérie bien construit ne devrait réunir dans les salles communes que les enfants convalescents ayant déjà séjourné plus de 15 jours à l'hôpital. Tout entrant est suspect et doit être isolé dans des sortes de boxes, clos, faciles à désinfecter, et disposés de telle sorte que le personnel ne puisse transporter les infections de malade à malade. E. Roux.

LA PESTE BUBONIQUE A HONG-KONG

PAR LE Dr YERSIN

Ancien préparateur à l'Institut Pasteur, médecin de 2 classe des Colonies.

AVEC LA PLANCHE XII

Au commencement du mois de mai dernier, éclatait, à Hong-Kong, une épidémie de peste bubonique très meurtrière pour la population chinoise de cette ville. La maladie sévissait depuis très longtemps, à l'état endémique, sur les hauts plateaux du Yunnam et avait fait, de temps à autre, quelques apparitions tout près de la frontière de nos possessions indo-chinoises, à Mong-tzé, à Lang-Tchéou et à Pakhoï. En mars, cette année, elle fit son apparition à Canton et, en quelques semaines, occasionna plus de 60,000 décès dans cette ville. Le grand mouvement commercial existant entre Canton et Hong-Kong d'une part, entre Hong-Kong et le Tonkin d'autre part, et la difficulté d'établir, sur le littoral de ces contrées, une quarantaine réellement efficace, fit craindre au gouvernement français que l'Indo-Chine ne fût envahie par l'épidémie.

Je reçus du ministère des Colonies l'ordre de me rendre à Hong-Kong, d'y étudier la nature du fléau, les conditions dans lesquelles il se propage, et de rechercher les mesures les plus efficaces pour l'empêcher d'atteindre nos possessions [1].

Lorsque j'arrivai dans cette ville, le 15 juin, plus de 300 Chinois avaient déjà succombé. On construisait en toute hâte des baraquements provisoires, les hôpitaux de la colonie ne pouvant plus suffire à abriter les malades.

Je m'installai avec mon matériel de laboratoire dans une cabane en paillotte que je fis construire, avec l'autorisation du gouvernement anglais, dans l'enceinte de l'hôpital principal.

La maladie, qui sévissait presque exclusivement dans les quartiers chinois de la ville, présente tous les symptômes et les caractères cliniques de l'ancienne *peste à bubons* qui a décimé

1. Voir *Acad. des sciences*, n° du 30 juillet 1894, une note de M. Yersin sur le même sujet.

maintes fois, dans les siècles passés, les peuples de l'Europe occidentale comme ceux du Levant. La fameuse épidémie de Marseille, en 1720, fut la dernière en date dont la France ait eu à souffrir. Depuis cette époque, le fléau est resté à peu près confiné en quelques foyers limités de la Perse, de l'Arabie et de la province chinoise du Yunnam.

Voici les symptômes de la maladie :

Début brusque après une incubation de 4 jours et demi à 6 jours; accablement, prostration.

On est subitement atteint d'une forte fièvre, souvent accompagnée de délire. Dès le premier jour, un bubon généralement unique apparaît. 75 fois sur cent, ce bubon siège dans l'aîne; 10 fois sur cent dans l'aisselle; rarement à la nuque ou dans d'autres régions.

Le ganglion atteint très vite la grosseur d'un œuf de poule. La mort arrive au bout de 48 heures et fréquemment plus tôt. Quand la vie se prolonge au delà de 5 à 6 jours, le pronostic est meilleur, le bubon s'est alors ramolli; on peut l'opérer pour donner issue au pus.

Dans quelques cas, le bubon n'a pas le temps de se former : on n'observe alors que des hémorrhagies des muqueuses ou des taches pétéchiales sur la peau.

La mortalité est très forte : 95 0/0 environ dans les hôpitaux!

Dans les quartiers infectés, beaucoup de rats morts gisent sur le sol. Il est intéressant de noter que, dans la partie de la ville où l'épidémie a éclaté en premier lieu et a causé le plus de ravages, on venait d'installer une nouvelle canalisation d'égouts. Les conduits, de dimensions beaucoup trop exiguës, sont séparés de distance en distance par des cuvettes à décantation dont le nettoyage est presque impossible et qui constituent, par suite, des foyers multiples et permanents d'infection. On ne comprend pas pourquoi il existe à Hong-Kong deux égouts distincts : l'un large et bien conditionné, pour drainer l'eau de pluie; l'autre étroit, s'obstruant constamment, pour les eaux ménagères et les détritus des maisons.

Les cabinets d'aisances sont formés de tinettes mobiles que l'on change tous les jours et dont le contenu, après avoir subi certaine préparation, sert à fertiliser les innombrables jardins chi-

nois qui bordent la rivière de Canton, en face de l'île de Hong-Kong.

Les logements, occupés par les Chinois des classes pauvres, sont partout des bouges infects où l'on ose à peine entrer et où s'entasse un nombre incroyable de personnes. Beaucoup de ces taudis n'ont pas même de fenêtres et sont au-dessous du niveau du sol. On comprend les ravages que peut occasionner une épidémie lorsqu'elle s'établit sur un tel terrain, et la difficulté que l'on doit éprouver à l'enrayer! Le seul remède eût été d'incendier la ville chinoise : il a été proposé, mais des raisons budgétaires ont empêché d'y donner suite.

Peu d'Européens, jusqu'à présent, ont été frappés par la maladie, grâce aux conditions de salubrité bien meilleures des maisons et des quartiers qu'ils habitent. Ces maisons européennes ne sont pas, néanmoins, à l'abri de tout danger, car maintes fois on y rencontre des rats morts, indices certains du très proche voisinage des germes infectieux.

Les médecins des douanes chinoises qui avaient eu l'occasion d'observer les épidémies de Pakhoï et de Lien-Chu, dans la province de Canton, et M. Rocher, consul de France à Mong-Tzé, avaient déjà remarqué que le fléau, avant de frapper les hommes, commence par sévir avec une grande intensité sur les souris, les rats, les buffles et les porcs. (Netten Redcliffe, *Ninth annual report of the local gov. board*, 1881, et Dr Pichon, *Voyage au Yunam.*)

L'aptitude particulière de certains animaux à contracter la peste me permettait donc d'entreprendre dans de bonnes conditions une étude expérimentale de la maladie.

Il était tout indiqué de rechercher tout d'abord s'il existe un microbe dans le sang des malades et dans la pulpe des bubons.

La pulpe des bubons est, dans tous les cas, remplie d'une véritable purée d'un bacille court, trapu, à bouts arrondis, assez facile à colorer par les couleurs d'aniline, et ne se teignant pas par la méthode de Gram. Les extrémités de ce bacille se colorent plus fortement que le centre, de sorte qu'il présente souvent un espace clair en son milieu. Quelquefois, les bacilles paraissent comme entourés d'une capsule. On le retrouve en très grande quantité dans tous les bubons et les ganglions des malades. Le sang en renferme quelquefois, mais en beaucoup moins grande abondance : on ne l'y rencontre que dans les cas très graves et rapidement mortels.

La pulpe de bubon, ensemencée sur gélose, donne un développement de colonies blanches, transparentes, présentant des bords irisés lorsqu'on les examine à la lumière réfléchie.

La culture se fait encore mieux sur gélose glycérinée. Le bacille croît aussi sur le sérum coagulé.

Dans le bouillon, le bacille offre un aspect très caractéristique, rappelant tout à fait les cultures de l'érysipèle : liquide clair, grumeaux déposés le long des parois et au fond du tube.

La solution alcaline de peptone à 2 0/0, additionnée de 1 à 2 0/0 de gélatine, est le milieu le plus favorable.

Ces cultures examinées au microscope montrent de véritables chaînes de bacilles courts, présentant par places de gros renflements en boule. Sur gélose, si l'on examine avec beaucoup de soin et avec un fort grossissement, on constate des bacilles au milieu des formes normales, tantôt grêles, tantôt de grosses chaînes constituées par des bâtonnets accolés latéralement.

Ces formes renflées et anormales deviennent de plus en plus nombreuses dans les cultures anciennes, elles prennent mal les matières colorantes.

Si on inocule la pulpe du bubon à des souris, à des rats ou à des cobayes, on tue sûrement ces animaux, et ils présentent à l'autopsie des lésions caractéristiques, avec de nombreux bacilles dans les ganglions, dans la rate et dans le sang. Les cobayes meurent dans un délai moyen de 2 à 5 jours ; les souris en 1 à 3 jours. On trouve, surtout dans les premiers passages, des microbes englobés dans les leucocytes mononucléaires.

Chez le cobaye, au bout de quelques heures, on sent déjà un œdème au point d'inoculation ; les ganglions voisins deviennent perceptibles au toucher. Au bout de 24 heures, son poil se hérisse, il ne mange plus, puis soudain il tombe sur le côté et devient la proie de crises convulsives de plus en plus rapprochées jusqu'à la mort.

Si l'on ouvre le corps aussitôt, on trouve des hémorrhagies de la paroi abdominale, et, à l'endroit inoculé, un œdème rosé très étendu, autour du ganglion voisin qui est très gros et rempli de bacilles. L'intestin est souvent hyperhémié, les capsules surrénales congestionnées, les reins violacés, le foie gros et rouge ; la rate, très grosse, présente fréquemment une sorte d'éruption de petits tubercules miliaires. Dans le cas de maladie un peu prolongée il existe, parfois, des abcès de la paroi abdominale.

Dans la plèvre et le péritoine, il existe un peu de sérosité contenant le bacille. Celui-ci existe aussi dans le sang où il prend une forme plus allongée que dans les ganglions. Le foie et la rate sont également très riches en microbes.

On peut facilement faire des passages de cobaye à cobaye à l'aide de la pulpe de rate ou du sang. La mort arrive plus vite après quelques passages.

Les pigeons ne meurent pas quand on leur inocule une dose modérée, soit de la pulpe de bubon, soit d'une culture du bacille de la peste.

Une première culture ayant pour origine un bubon est pénible sur la gélose-peptone. Elle se développe cependant et tue aussi vite que la pulpe de bubon.

On remarque au bout de quelques jours, sur ces cultures, qu'un certain nombre de colonies se développent beaucoup plus que les autres. Examinées au microscope, toutes contiennent le bacille pur. Si on les ensemence de façon à séparer les germes, les nouvelles colonies se développent avec une plus grande rapidité. Lorsqu'on inocule celles-ci aux animaux, on constate que leur virulence est singulièrement diminuée : elles ne tuent plus les cobayes qu'en un temps assez long ou ne les tuent plus du tout, mais elles font encore périr les souris blanches.

J'ai constaté que, sur gélose, les colonies moins virulentes se développent plus vite et tendent à étouffer les autres, en sorte que les cultures successives perdent très vite leur virulence.

En leur faisant ingérer soit des cultures, soit des fragments de rate ou de foie d'animaux morts de la peste, on tue souvent les souris, presque toujours les rats. A l'autopsie, on retrouve le bacille dans le sang, le foie, la rate et les ganglions.

Les souris qui ont résisté à plusieurs repas contaminés meurent quand on les inocule sous la peau.

Les rats crevés qu'on trouve dans les maisons et dans les rues contiennent presque toujours le microbe en grande abondance dans leurs organes. Beaucoup d'entre eux présentent de véritables bubons,

J'ai placé dans le même local des souris saines et des souris inoculées : les souris inoculées sont mortes les premières; mais, les jours suivants, les souris saines ont toutes succombé les unes après les autres, avec le bacille de la peste dans leurs organes.

La peste est donc une maladie contagieuse et inoculable. Il est probable que les rats en constituent le principal véhicule, mais j'ai constaté également que les mouches prennent la maladie, en meurent, et peuvent ainsi servir d'agents de transmission.

J'avais remarqué que, dans le laboratoire où je fais mes autopsies d'animaux, il y avait beaucoup de mouches crevées. J'ai pris une de ces mouches, et après lui avoir arraché les pattes, les ailes et la tête, je l'ai broyée dans du bouillon et l'ai inoculée à un cobaye. Le liquide d'inoculation contenait une grande quantité de bacilles absolument semblables à celui de la peste, et le cobaye est mort en 48 heures avec les lésions spécifiques de la maladie.

J'ai pu isoler le bacille de la peste de la terre recueillie à 4 à 5 centimètres de profondeur dans le sol d'une maison infectée, et où on avait fait des tentatives de désinfection; il était tout à fait semblable à celui retiré des bubons, mais il n'était pas virulent.

J'ai dit plus haut que, dans les cultures provenant du sang ou d'un bubon de malade atteint de peste, on pouvait isoler plusieurs variétés du bacille différant entre elles par leur virulence à l'égard des animaux, et que certaines colonies avaient même perdu toute virulence pour le cobaye. En ensemençant la pulpe d'un ganglion qu'on extirpait à un malade convalescent depuis trois semaines, j'ai pu obtenir quelques colonies absolument dépourvues de toute virulence, même pour la souris.

Chez un autre malade guéri depuis quinze jours et qui présentait une énorme pétéchie sur la cuisse, j'ai retrouvé le bacille virulent pour le cobaye et la souris.

Ces faits, très suggestifs, me permettent de supposer que l'inoculation de certaines races ou variétés peu ou point virulentes du bacille spécifique serait sans doute capable de donner aux animaux l'immunité contre la peste. J'ai commencé, dans cette voie, des expériences dont je publierai les résultats ultérieurement.

EXPLICATION DES PHOTOGRAPHIES. PL. XII.

PHOT. 1. — Pulpe du bubon d'un Chinois atteint de peste.
PHOT. 2. — Pulpe de ganglion d'un rat mort spontanément de la peste.
PHOT. 3. — Culture jeune du cocco-bacille de la peste dans le bouillon.
PHOT. 4. — Pulpe de ganglion d'une souris inoculée avec une culture.
PHOT. 5. — Sang recueilli chez un homme mourant de peste foudroyante, 1/4 d'heure avant la mort.
Il n'y a que deux bacilles dans le champ.

NOUVEL APPAREIL A CONTENTION

POUR ANIMAUX D'EXPÉRIENCES

PAR M. A LATAPIE

Cet appareil sert à attacher très rapidement, et très solidement, en profitant de la disposition anatomique de leurs membres, tous les animaux servant aux expériences de laboratoire, lapins, cobayes, poules, pigeons etc. Il permet en outre de faire passer l'animal du dos sur le ventre au cours de l'opération, sans libérer les pattes postérieures.

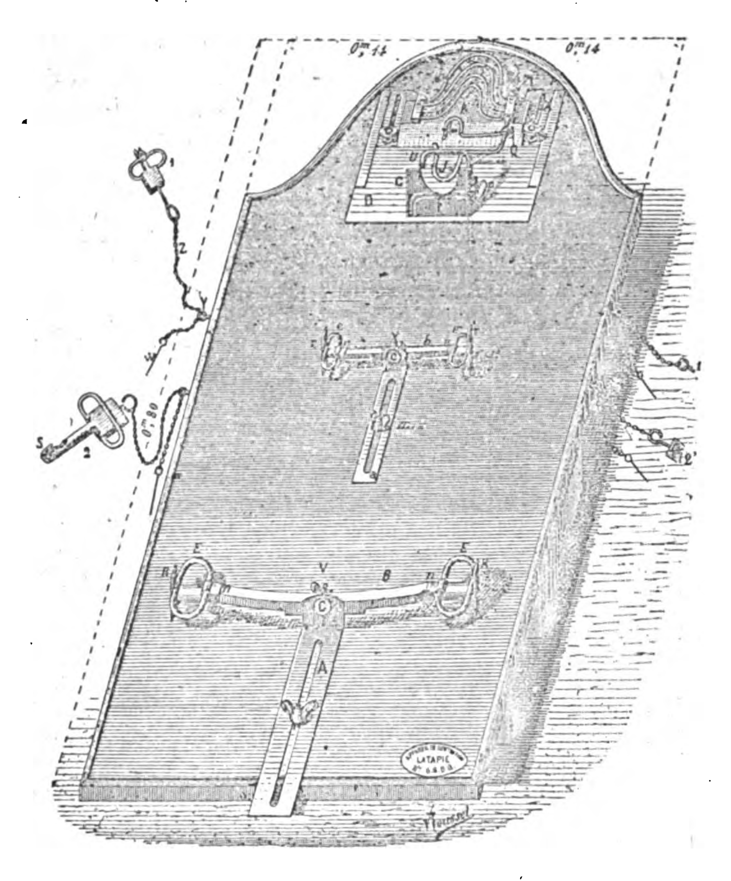
Il se compose essentiellement d'une planchette, munie à ses deux extrémités de deux dispositifs mobiles d'avant en arrière, destinés à saisir l'un la tête, l'autre les pattes postérieures, et se prêtant ainsi à toutes les adaptations en longueur.

Le dispositif d'arrière est une règle métallique A, plate, coulissant autour d'un pas de vis qui peut servir à la fixer, et portant en avant une tige métallique *B* légèrement incurvée et pouvant tourner dans un plan vertical autour d'un axe *C* porté par la branche verticale de la règle; c'est à l'aide de cette rotation qu'on peut retourner du dos sur le ventre l'animal dont les pattes postérieures restent fixées.

La tige horizontale *B* porte à chacune de ses extrémités un anneau allongé, pouvant se rabattre à droite ou à gauche. Pour fixer un animal, un lapin par exemple, on allonge le membre postérieur sur la tige, et on rabat l'anneau de façon à lui faire embrasser l'angle saillant formé par la flexion de la jambe sur la cuisse. L'anneau ainsi rabattu est solidement maintenu par un crochet-ressort porté par la pièce R, et le membre se trouve absolument immobilisé.

Les membres postérieurs fixés, on passe à la tête : on applique la nuque ou la gorge de l'animal sur la pièce évidée E, et on complète la lunette au moyen de la tige coudée U qui

coulisse verticalement sur le bloc G, et se fixe à l'aide d'une vis *P*. On approche alors le chariot *K* qui coulisse à droite et à gauche sur *XX*, et porte une série de muselières. On choisit la plus commode, et on en embrasse soit le museau de l'animal,



si celui-ci est sur le ventre, ou on la fait passer derrière les angles du maxillaire inférieur, s'il est sur le dos.

Dans le cas d'une poule ou d'un pigeon, on se sert, pour saisir l'occiput de l'oiseau, d'un crochet semblable à celui de M. Malassez, porté par une tige horizontale qu'on fixe avec une vis. Un second crochet, mobile dans un plan vertical et maintenu par une vis *Q*, appuie de haut en bas sur le bec et complète l'immobilisation.

La tête et les membres postérieurs fixés, on donne à

l'animal le degré d'extension voulu en éloignant les chariots, et on fixe les pattes antérieures à l'aide de deux autres anneaux allongés portés par une tige fixée à une chainette *Z*. La portion de la tige qui est comprise entre l'anneau et le crochet destiné à le retenir est passée transversalement dans le pli du coude; on rabat l'anneau qui vient embrasser l'angle saillant résultant de la flexion de l'avant-bras sur le bras; puis on maintient le tout au moyen du crochet. Cela fait, pour donner aux pattes antérieures l'extension suffisante, on tire sur la chaînette au travers de l'anneau *Y*, et par la maille la plus rapprochée de cet anneau, on introduit une petite tige métallique qui termine la chaînette. Tout cela se fait sans aide et en quelques instants.

La planchette porte un second chariot d'arrière pour des animaux plus petits, cobaye, pigeon, et les anneaux latéraux correspondants.

UNE LETTRE RELATIVE A L'INSTITUT PASTEUR

Les recueils les plus sérieux ont le droit de s'amuser quelquefois, ne fût-ce que pendant les vacances, et c'est à titre d'amusement pour mes lecteurs que je reproduis le passage suivant d'une lettre que je viens de recevoir :

Vichy, le 24 août 1894.

..... A la table d'hôte de l'Hôtel de Vichy où je prends les eaux, on a soutenu qu'à l'Institut Pasteur, quand se produit un cas de rage inguérissable parce que la maladie arrive à sa dernière période, et qu'il y a des accès, le malade, placé dans une baignoire, a les veines ouvertes, ou bien qu'il est empoisonné.

Ce procédé serait contraire aux lois religieuses, et aussi, à ce que je crois, aux lois humaines. J'ai donc démenti le fait autant que j'ai pu. Me donneriez-vous un argument plus décisif en me disant d'un mot ce qui se passe.

Merci d'avance.

Votre tout dévoué, J. L.

J'ai répondu qu'à l'Institut Pasteur nous n'avions pas de baignoire pour ouvrir les veines des malades, ni même de lit pour les laisser mourir quand la rage éclatait chez eux. Nous les envoyons à l'Assistance publique, qui a la complaisance de les accueillir et la charité de les soigner jusqu'à leurs derniers moments. Au surplus, nous publions régulièrement les noms des malades morts dans ces conditions, avec l'indication de l'hôpital qui les a recueillis, et tous les renseignements permettant de retrouver leur histoire ou leurs traces. Tout cela se fait au grand jour, comme dans tous les services de l'Assistance publique à Paris et en province.

On n'a pas accusé jusqu'ici les hôpitaux de se débarrasser de leurs malades par le fer et le poison ; mais l'Institut Pasteur est, paraît-il, plus sujet à caution. N'est-il pas un peu attristant que de pareilles affirmations puissent être produites tout haut à la table d'hôte d'un hôtel fréquenté, et qu'il ait fallu la présence fortuite d'un ami pour me les faire connaître et les démentir ? Comment s'étonner, si de pareils bruits courent et rencontrent créance, qu'il y ait encore tant de mordus qui hésitent à venir à l'Institut Pasteur, même lorsqu'on leur paie le voyage ? J'en sais dix dans un seul village, qui ont résisté à l'appât d'un voyage gratuit à Paris et à la pression de leur curé. Ils se méfient, restent chez eux, ou vont manger chez quelque sorcier du voisinage l'omelette traditionnelle, car il y a toujours quelque fissure par où la méfiance s'épanche en sotte crédulité. Le curieux de l'affaire est que cette idée de veines ouvertes dans une baignoire, ces visions de boucherie dans un hammam, sont des souvenirs classiques, et n'ont pu venir qu'à un buveur ayant de la lecture ou de l'éducation : on peut dire qu'il avait tiré profit de ses études ! Puissent au moins les Eaux de Vichy lui avoir détergé la cervelle !

E. Duclaux.

INSTITUT PASTEUR

STATISTIQUE[1]. DU TRAITEMENT PRÉVENTIF DE LA RAGE. — AOUT 1894

	A			B			C		
Morsures à la tête et à la figure { simples	»	1	1	»	1	3	»	1	3
Morsures à la tête et à la figure { multiples	»	»		»	2		»	2	
Cautérisations efficaces	»	»	»	»	»	»	»	»	»
— *inefficaces*		»	»	2	»	»	1	»	»
Pas de cautérisation	1	»	»	1	»	»	2	»	»
Morsures aux mains { simples	»	1	1	»	17	37	»	8	13
Morsures aux mains { multiples	»	»		»	20		»	5	
Cautérisations efficaces	»	»	»	»	»	»	»	»	»
— *inefficaces*	»	»	»	15	»	»	5	»	»
Pas de cautérisation	1	»	»	22	»	»	8	»	»
Morsures aux membres et au tronc { simples	»	»	1	»	8	35	»	4	20
Morsures aux membres et au tronc { multiples	»	1		»	27		»	16	
Cautérisations efficaces	»	»	»	»	»	»	»	»	»
— *inefficaces*	»	»	»	20	»	»	15	»	»
Pas de cautérisation	1	»	»	15	»	»	5	»	»
Habits déchirés		»	»	23	»	»	15	»	»
Morsures à nu	1	»	»	12	»	»	5	»	»
Morsures multiples en divers points du			»		1	1			»
corps	»	»	»	»	»	»	»	1	1
Cautérisations efficaces	»	»	»	»	»	»	»	»	»
— *inefficaces*	»	»	»	»	»	»	1	»	»
Pas de cautérisation	»	»	»	1	»	»	»	»	»
Habits déchirés	»	»	»	»	»	»	1	»	»
Morsures à nu	»	»	»	1	»	»	»	»	»
Totaux. { Français et Algériens		3	3		67	79		37	37
Totaux. { Etrangers		»			9			»	
		A			B			C	
TOTAL GÉNÉRAL					116				

Les animaux mordeurs ont été : chiens, 104 fois; chats, 12 fois.

Le Gérant : G. MASSON.

Sceaux. — Imprimerie Charaire et Cie.

1

2

3

4

5

CLICHÉ BURAIS

PROCÉDÉ

L

DU

Le
bien é
infecti
de l'org
qu'à ch
minée ;
tose qui
Ces réac
dies inf
plan, de
étaient p
sur le tét
ne pas ci
les condit
aire de l
é dévelop
oison sp
dans de pl
a question
des propr
nique pa
ines part
Pour m

8me ANNÉE OCTOBRE 1894 No 10.

ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

DU ROLE DES LEUCOCYTES DANS L'INFECTION DIPHTÉRIQUE

Par G. GABRITSCHEWSKY.

(Travail du laboratoire de M. METCHNIKOFF, à l'Institut Pasteur.)

Les nombreuses observations faites jusqu'à présent ont déjà bien établi la relation étroite qui existe dans chaque maladie infectieuse entre les germes infectieux et les cellules amiboïdes de l'organisme. Cette relation est mise en évidence par le fait qu'à chaque infection correspond une réaction leucocytaire déterminée ; cette réaction est suivie par l'évolution de la phagocytose qui est également soumise aux lois qui lui sont inhérentes. Ces réactions cellulaires ont été prouvées même dans les maladies infectieuses où l'intoxication se manifeste au premier plan, de sorte que l'on était porté à croire que les leucocytes n'y étaient pour rien. Après les travaux de MM. *Vaillard et Vincent* (1) sur le tétanos, et ceux de M. *Cantacuzène* (2) sur le choléra, pour ne pas citer les autres, il ne peut y avoir aucun doute que toutes les conditions qui empêchent ou retardent la réaction leucocytaire de l'organisme sont en même temps celles qui favorisent le développement des germes infectieux et la production du poison spécifique par ces derniers. Je ne crois pas devoir entrer dans de plus amples détails, trop connus de ceux qui ont étudié la question de l'immunité, et j'aborderai directement l'exposé de mes propres observations sur la diphtérie — cette maladie toxique par excellence — qui se distingue, avant tout, par certaines particularités de la réaction leucocytaire de l'organisme.

Pour mieux comprendre ces particularités, il faut se rappeler

que nous avons plusieurs types de réactions leucocytaires dans les maladies infectieuses. Le plus répandu, c'est la leucocytose dans la pneumonie fibrineuse, où la quantité des leucocytes est en proportion directe avec l'intensité de l'infection, de sorte que l'absence de la leucocytose pendant la maladie nous autorise à penser que, pour une raison quelconque, l'organisme est privé des moyens naturels de se défendre contre l'envahissement des germes infectieux, et, plus le nombre des leucocytes diminue, plus le pronostic devient difficile. Ce fait peut être considéré comme prouvé après les récents travaux de MM. *Kikodze* (3), *Iaksch* (4), *Rieder* (5) et *Tchistowitseh* (6). Dans quelques autres maladies, la fièvre typhoïde et la rougeole, par exemple, le nombre des leucocytes n'est ordinairement pas augmenté, et dans la fièvre typhoïde leur nombre est même diminué. Il résulte donc que, dans les deux cas précités, la leucocytose indique une marche anormale de l'infection et des complications dues pour la plupart à des infections secondaires. C'est pour cette raison que le pronostic en serait relativement défavorable.

Nous verrons plus loin que la marche de la leucocytose dans la diphtérie ne correspond pas aux types ordinaires, et qu'à côté de la leucocytose générale du sang, il faut distinguer encore la leucocytose locale qui se manifeste par l'infiltration purulente et la formation du pus. Si, dans la majorité des cas, la première précède la seconde, ou si les deux surgissent parallèlement, cette règle n'est pas applicable à un certain nombre de maladies infectieuses. Nous savons avant tout que les animaux immunisés, et naturellement réfractaires contre certains virus, peuvent réagir avec une moins grande leucocytose générale que les animaux non immunisés et sensibles aux mêmes virus, et néanmoins la leucocytose locale et la phagocytose non seulement ne sont pas moins développées, mais elles sont même plus accusées. Au point de vue de la chimiotaxie, tous ces faits peuvent être facilement expliqués, et chaque cas d'infection devra être étudié sous ce double rapport.

C'est précisément le problème que nous nous sommes posé en étudiant la diphtérie, d'autant plus que dans cette direction aucune recherche n'avait encore été faite. En outre, nous avons recueilli quelques observations qui pourront être utiles pour déterminer le rôle de la phagocytose dans la diphtérie.

J'ai eu l'occasion d'étudier la leucocytose sur des enfants diphtériques, à l'hôpital, et sur des lapins, au laboratoire. Grâce à l'extrême obligeance de M. *Roux*, j'ai pu suivre les malades soumis au traitement par le sérum antitoxique. Tous les détails de ce traitement ont été publiés par M. *Roux*, et je me bornerai à observer que les propriétés de ce sérum sont telles, qu'il suffit de 1/500,000 de centimètre cube pour qu'un cobaye d'une taille moyenne soit immunisé contre la dose mortelle minima.

Les recherches bactériologiques faites par M. *Martin* ont porté sur les 10 cas de diphtérie constatés à l'hôpital des Enfants-Malades; d'après ces indications bactériologiques, nous avons noté si les malades étaient atteints ou non de diphtérie bacillaire, sans tenir compte des complications infectieuses.

Je profite de la présente occasion pour témoigner à MM. *Roux* et *Martin* ma profonde gratitude pour les indications nécessaires à mon travail qu'ils ont bien voulu me donner. Les quatre autres cas de diphtérie que j'ai observés à l'hôpital *Trousseau* n'ont pas été traités par le sérum. Dans ces cas, j'ai fait moi-même le diagnostic bactériologique.

On verra dans l'Appendice que l'analyse du sang de ces malades a donné les résultats suivants :

1° Dans les 8 cas de diphtérie suivis de guérison, après chaque injection sous-cutanée de sérum (10 ou 20 c. c), le nombre des leucocytes du sang, qui, ordinairement, est augmenté au début de la maladie, et qui oscille dans nos cas entre 11,450 et 25,000, s'abaisse ensuite progressivement jusqu'au chiffre normal. La même diminution progressive de la leucocytose a été observée dans les deux cas où le sérum n'a pas été injecté, mais qui, également, ont été suivis de guérison ;

2° Dans les 3 cas de diphtérie à issue mortelle, le nombre des leucocytes du sang a été considérablement plus grand, et il oscillait entre 29,500 et 51,000 ;

3° Dans un cas (IX), où le malade à l'agonie était dans un état d'asphyxie, et où, par suite d'une brusque élévation du nombre de leucocytes (de 12,500 à 37,500), dans l'espace de 5 heures après l'injection du sérum, je m'attendais, par analogie avec le VIIIe cas, à une issue mortelle, le malade a guéri après la trachéotomie. L'analyse bactériologique a démontré que ce croup n'était pas d'origine diphtérique.

Au sujet de notre première conclusion nous ferons remarquer que le nombre des leucocytes était déterminé 1h 1/2, 2, 5, 7, 16 et 24 heures après l'injection de sérum, et que dans tous les cas, sans exception, la leucocytose avait diminué ; donc, pour la guérison de la diphtérie, il n'est pas nécessaire que la leucocytose générale soit augmentée, et cette augmentation donne, au contraire, un mauvais pronostic.

En général, nous avons obtenu les mêmes résultats, dans nos expériences sur les lapins soumis à la sérumthérapie. En examinant les 2 tables de l'appendice (B), qui s'y rapportent, nous pourrons nous convaincre que la leucocytose atteint progressivement son maximum quelques heures avant la mort ; c'est ainsi que chez les 2 lapins qui n'avaient pas reçu d'injection de sérum, le nombre des leucocytes du sang a atteint 26,000 à 36,000 ; chez les 2 lapins ayant reçu 0,5 de sérum chacun, l'un 7 heures après l'injection, et l'autre à deux reprises, la première 7 heures après et la seconde 3 jours après l'injection, la leucocytose s'est manifestée par son maximum de 29,900 à 35,000. 3 lapins ayant survécu à la dose mortelle de culture diphtérique n'ont pas eu, pendant la durée de la maladie, plus de 17,900, 15,000 et 19,000, c'est-à-dire, approximativement les mêmes chiffres que dans les cas de diphtérie humaine terminés par la guérison. En comparant la leucocytose diphtérique humaine à celle des lapins, nous constatons une différence insignifiante. Chez les enfants malades convalescents, nous observons toujours la diminution progressive de la leucocytose qu'ils avaient ordinairement en entrant à l'hôpital ; chez les lapins traités par le sérum, 7 heures après l'inoculation du virus, la leucocytose n'est pas diminuée, ce qui pouvait dépendre, dans le cas donné, soit de la dose insuffisante du sérum, — d'autant plus que chez un lapin ayant guéri après la deuxième injection du sérum le nombre des leucocytes est tombé de 12,000 à 8,200, — soit d'autres causes.

Pour expliquer la marche de la réaction leucocytaire pendant la diphtérie, il était nécessaire de déterminer encore l'influence du sérum sur l'organisme non infecté. Dans ce but nous avons fait une expérience sur deux lapins immunisés par 0,5 c. c. de sérum, et sur deux lapins témoins, non immunisés. Ainsi qu'il ressort de la table B. III, on voit que, pendant 24 heures, le maximum des leucocytes du sang des animaux immunisés a

été de 11,500-18,500, tandis que chez les témoins, le maximum n'était que de 9,800 à 10,800. Nous ne savons pas quelle influence exerce chez les enfants l'injection préventive du sérum sur le chiffre des leucocytes du sang, mais chez les lapins le sérum peut augmenter leur nombre dans les premières 24 heures.

L'observation clinique et les expériences faites sur les animaux nous permettent d'affirmer que la leucocytose générale pendant la diphtérie suit une marche diamétralement opposée à celle de la leucocytose de la pneumonie fibrineuse ; dans le premier cas, la leucocytose progressive se termine par la mort et dans le second cas, cette leucocytose annonce une issue favorable. Pour expliquer cette différence de la réaction leucocytaire générale dans ces deux maladies, il faut avant tout connaître que, dans la diphtérie, nous avons affaire principalement à une intoxication, et, dans la pneumonie fibrineuse, à une infection, de sorte que la leucocytose modérée existant au début de la diphtérie peut être suffisante pour provoquer la leucocytose locale et ensuite la phagocytose qui détruit le producteur même du poison. Il ne faut pas juger d'après la leucocytose générale les phénomènes locaux de l'infection, comme nous allons le démontrer.

II

Une série de faits montrent la réaction cellulaire locale et la phagocytose sur des parties atteintes de processus diphtérique et dans le pus des animaux.

M. *Löffler* (7) signale, dans son premier travail sur la diphtérie, l'apparition des phagocytes autour de l'endroit des injections sous-cutanées de culture.

D'après les recherches de M. *Ruffer* (8), on rencontre des phagocytes dans les membranes diphtériques de l'homme. *M. Ruffer* pense que si les bacilles diphtériques restent à la surface de la membrane sans pénétrer dans les parties profondes des tissus, c'est parce que les leucocytes sont un obstacle naturel à cette infiltration, en détruisant et en digérant les bacilles.

M. *Lubarsch* (9) a fait plusieurs observations sur la phagocytose dans l'infection diphtérique. Très intéressante est la con-

statation de ce fait que la phagocytose est d'autant plus accusée que la culture est plus virulente [1].

M. *Massart,* en 1892, a fait voir aussi que plus la culture diphtérique est virulente, plus elle attire les leucocytes du sang des cobayes.

En 1894, M. *Bardach* (10) parle de la propriété purulente des bacilles diphtériques, et confirme l'observation de M. *Massart*. Les cultures vivantes du bacille diphtérique et son poison possèdent des propriétés chimiotaxiques positives, surtout chez les chiens, ensuite chez les cobayes, plus faibles chez les lapins. Ce savant a retiré du pus des cultures plus virulentes que celles qui étaient injectées, et comme les bacilles diphtériques étaient contenus dans des phagocytes, il en a conclu que les derniers sont capables de détruire les bacilles les plus virulents.

Enfin, d'après le récent travail de M. *Kutscher* (11), on voit que les foyers broncho-pneumoniques sont dus aux bacilles diphtériques. A l'analyse microscopique, dans huit des neuf cas examinés, on a pu trouver les bacilles principalement dans les parties congestionnées des poumons; la plus grande partie des bacilles était contenue dans les phagocytes.

D'un autre côté, l'existence de la leucocytose locale, qui, comme l'on sait, précède la phagocytose, est démontrée par les recherches de MM. *Cornil* et *Ranvier*, *Binault*, *Morel* (12) et plusieurs autres auteurs, d'après lesquelles on trouve, dans les amygdales de l'homme atteintes de processus diphtérique, une accumulation des leucocytes du sang.

Nous nous sommes bornés à étudier la phagocytose de la diphtérie expérimentale, parce que l'étude des phagocytes dans les membranes diphtériques des malades est accompagnée de tant de difficultés, que nous avons dû renoncer à en faire l'expérience; d'autre part, les recherches sur les phagocytes d'après les préparations anatomo-pathologiques nous privaient des moyens d'avoir affaire à des cas se terminant par la guérison, dans lesquels, comme nous supposions, l'étude de la phagocytose offre le plus d'intérêt. Nous nous sommes arrêtés aux expériences suivantes, espérant que de cette manière nous pourrons expliquer la corrélation entre la leucocytose du sang et la réaction cellulaire

1. Je regrette de n'avoir pas pu citer ce travail de M. Lubarsch d'après l'original.

locale. On immunise 3 ou 4 lapins, 24 heures avant l'expérience, avec 0,5 c. c. de sérum antitoxique, après quoi on injecte à ces lapins et aux 3 ou 4 lapins non immunisés, une épaisse émulsion de culture de bacilles diphtériques dans la chambre antérieure des yeux, après avoir retiré l'humeur aqueuse. Ensuite on détermine le nombre des leucocytes du sang après 1, 3, 8 et 24 heures, et, après chaque examen du sang, on fait l'énucléation des yeux infectés. On fixe les yeux enlevés dans une solution saturée de sublimé avec 2 0/0 d'acide acétique, et on les prépare pour les coupes d'après les règles ordinaires. C'est ainsi qu'on a pu observer la différence des réactions leucocytaires chez les animaux immunisés et ceux qui ne l'étaient pas.

Des tables ci-annexées (C. I.-II) on peut déduire ce qui suit :

1° La réaction leucocytaire générale (leucocytose du sang) est plus accusée chez les animaux non immunisés que chez les immunisés ;

2° La marche de la leucocytose est diverse dans ces deux cas : chez les lapins témoins, la leucocytose augmente progressivement ; chez les lapins immunisés, la leucocytose, après avoir atteint son maximum 8 heures après l'inoculation, disparaît au bout de 24 heures ;

3° Le degré de la leucocytose générale n'est pas proportionnel au degré de la leucocytose locale, c'est-à-dire d'émigration des leucocytes dans la chambre antérieure de l'œil et d'infiltration purulente du tissu de l'iris ;

4° L'émigration des leucocytes dans la chambre antérieure de l'œil commence déjà au bout d'une heure après l'infection, et peu de temps après apparaît la phagocytose ;

5° L'activité phagocytaire chez les lapins immunisés s'opère avec une plus grande énergie que chez les lapins témoins, de sorte qu'au bout de 8 heures il est impossible de constater, dans la chambre antérieure de l'œil des lapins immunisés, la présence des bacilles diphtériques libres (puisqu'ils se trouvent tous contenus dans les phagocytes) ; tandis que chez les lapins non immunisés on peut observer, à côté de nombreux phagocytes, des cultures de bacilles diphtériques (voir la Pl. XIII) ;

6° Après 24 heures, la différence peut être encore plus accusée sous ce rapport. Dans deux expériences sur trois, faites sur des

lapins immunisés, on n'a pas trouvé du tout de bacilles au bout du dit laps de temps (C. II-III);

7° Le virus diphtérique est un poison nécrotisant;

8° La différence du sort du bacille diphtérique dans l'organisme de ces deux catégories d'animaux, s'explique en partie par la nécrose plus rapide des leucocytes chez les animaux non immunisés. Déjà 8 heures après l'injection de l'œil de ces animaux, on peut constater la présence de beaucoup de leucocytes nécrosés, dont les noyaux désagrégés ont l'aspect de petites boules fortement colorées. 24 heures après l'infection, cette nécrose atteint le maximum de son évolution.

Ainsi, nous voyons que, dans l'infection diphtérique, l'activité phagocytaire des leucocytes est subordonnée aux lois établies par M. *Metchnikoff;* toutefois il est à remarquer que dans cette infection la nécrose des leucocytes est très prononcée, et que par conséquent ils ne peuvent pas dans ces conditions terminer leur activité phagocytaire. MM. *Löffler*, *Roux* et *Yersin*, *Behring* et autres savants ayant étudié la diphtérie, ont constaté les propriétés nécrotisantes du virus diphtérique. M. *Œrtel* (13) considère l'affection nécrobiotique des ganglions lymphatiques comme le trait caractéristique de la diphtérie humaine. Cet auteur affirme que le virus diphtérique se manifeste dans son action visible par la mort de cellules, principalement des leucocytes et des cellules plus grandes, rondes, qui l'ont recueilli. M. *Ch. Morel* a observé les mêmes phénomènes de la nécrose, mais il pense qu'ils étaient dus à l'infection secondaire par le streptococcus. Nos préparations microscopiques prouvent que les cultures diphtériques pures provoquent une si forte nécrose des tissus atteints que, 24 heures après l'injection dans la chambre antérieure de l'œil, nous avons pu constater une nécrose complète de la partie antérieure de l'œil, une fois chez un lapin immunisé et deux fois chez les lapins non immunisés.

L'action du sérum sur les animaux se manifeste par une plus grande résistance des éléments cellulaires au virus diphtérique, et c'est pour cela que la phagocytose peut donner chez les sujets immunisés des résultats meilleurs que chez ceux qui ne le sont pas. 3 heures après l'infection de l'œil, la phagocytose chez les sujets immunisés et non immunisés est à peu près la même. Les

bacilles sont englobés et en partie digérés par les cellules; mais de ce moment, sous l'influence de la toxine, les leucocytes des animaux non immunisés commencent à périr, et le bacille diphtérique commence à pousser librement dans l'œil, de sorte qu'au bout de 24 heures, chez les témoins, toute la surface antérieure et postérieure de l'iris est couverte d'une masse de bacilles, tandis que les leucocytes décomposés nous expliquent le développement progressif du bacille diphtérique. Si pendant nos expériences nous n'avions pas énucléé les yeux, l'infection dans les dits cas se serait terminée par la nécrose de l'œil, et les quelques bacilles, qui pourraient rester dans l'organisme des lapins non immunisés, en seraient éliminés au moyen de la séquestration de la partie infectée, comme cela a lieu pour la muqueuse, ainsi que nous le verrons plus loin. Cette sortie de l'organisme des parties infectées *in toto*, peut le sauver dans les cas où les phagocytes, luttant avec le germe infectieux, périssent en masse sans pouvoir le détruire. Le processus de la guérison dans la diphtérie est différent suivant l'endroit de l'infection. La destruction des bacilles diphtériques dans l'organisme même commence par la phagocytose, et se termine par la nécrose et la séquestration de la partie infectée; à la surface des muqueuses, au contraire, la nécrose précède la phagocytose; cette dernière peut être observée principalement dans la seconde période du processus, lorsque la séquestration s'est opérée, et que les globules du pus, s'ils ne sont pas nécrosés à leur tour, se trouvent en contact direct avec les bacilles.

Avant d'aborder l'exposé de nos dernières expériences avec les fausses membranes chez les cobayes, et de nous occuper de la phagocytose dans les dites conditions, il faut nous arrêter sur les propriétés bactéricides et antitoxiques du sérum, pour pouvoir expliquer jusqu'à quel point, dans l'infection diphtérique, la guérison peut être attribuée à ces facteurs chimiques.

Déjà M. *Behring* avait indiqué que le sérum immunisant ne détruit pas les bacilles diphtériques. Quelques auteurs avaient également confirmé cette absence de propriétés bactéricides du sérum, et, ainsi qu'il appert des pièces justificatives (D), j'ai eu aussi l'occasion de me convaincre que le sérum immunisant du sang et l'humeur aqueuse des lapins immunisés, non seulement

ne détruisent pas les bacilles, mais offrent même un milieu favorable à leur développement, et que leur virulence augmente dans ces conditions. On ne peut donc expliquer la diminution des bacilles diphtériques dans la chambre antérieure de l'œil des lapins immunisés, ni par les propriétés atténuantes, ni par les propriétés bactéricides des humeurs. En ce qui concerne la propriété antitoxique du sérum, elle ne pourrait non plus expliquer la disparition des germes infectieux dans l'organisme. Voilà pourquoi il est possible d'obtenir l'infection diphtérique locale, même chez les animaux immunisés.

Les faits ci-dessus exposés déterminent le rôle des leucocytes par rapport au bacille diphtérique et non à sa toxine. Ce côté de la question est une sphère nouvelle de recherches, et il existe des faits qui démontrent que la réaction leucocytaire par rapport aux substances vénéneuses d'origine animale et végétale est sujette à de propres lois, comme M. *Chatenay* (14) l'a récemment prouvé. Il est fort possible que certaines espèces de cellules mésodermiques mobiles de l'organisme possèdent la propriété d'accaparer non seulement des parcelles dures étrangères, ce qui se manifeste par la phagocytose, mais aussi de s'imbiber des substances liquides solubles et de les rendre inoffensives aux autres cellules de l'organisme : c'est ce que l'on pourrait appeler la *pinocytose*. Les recherches de M. *Kobert* et de ses élèves MM. *Samoïloff* (15), *Lipski* (16) et autres, sur l'absorption par les leucocytes et les cellules endothéliales des sels de fer et d'argent en solution, rendent cette supposition très probable. Toutefois, avant ces savants, j'avais réussi à démontrer qu'en injectant dans l'organisme des animaux des solutions de peptone et de glucose, les leucocytes du sang présentent quelques heures après la réaction glycogène que l'on n'observe pas avant l'expérience (17). J'ai émis la supposition que les leucocytes s'imbibent des solutions de peptone et de sucre, et qu'ils les transforment en une substance qui donne avec l'iode la réaction caractéristique. Je ne puis admettre que, dans le cas donné, je n'avais pas affaire aux phénomènes physiologiques vitaux, mais seulement au processus nécrobiotique du protoplasma des leucocytes, puisque la réaction se manifestait principalement dans des leucocytes neutrophiles et jamais dans les lymphocytes.

J'aborderai maintenant l'exposé de mes expériences sur les cobayes. A 2 cobayes, immunisés 24 heures avant l'expérience avec 0,3 c. c. de sérum, et à 4 cobayes neufs, on a cautérisé la muqueuse de la vulve avec un petit bâton de verre chauffé; après quoi la surface cautérisée a été infectée avec une culture virulente (dans du bouillon) de bacille diphtérique. Au bout de 25 heures, un des cobayes non immunisés était mort à la suite de l'infection diphtérique. Au bout de 36 heures, un cobaye immunisé et un autre non immunisé ont été tués, et les vulves infectées de diphtérie ont été enlevées et préparées pour les coupes.

68 heures après, on a tué une autre paire de cobayes, immunisé et non immunisé; le sixième cobaye est mort dans la nuit du 2e au 3e jour après l'infection. A l'analyse macroscopique, on a constaté chez tous les cobayes des membranes diphtériques plus ou moins formées; chez les animaux immunisés elles étaient moins accusées. Une plus grande différence a été constatée par rapport à l'œdème inflammatoire des tissus environnants, qui a été incontestablement plus accusé chez les cobayes non immunisés.

A l'analyse microscopique, on peut distinguer, dans les coupes transversales des vulves, au bout de 36 heures, des couches successives superposées dans l'ordre suivant : la couche de culture diphtérique, ensuite la couche du tissu nécrosé ne contenant pas de leucocytes, plus loin la couche des globules de pus, et enfin le tissu normal avec des vaisseaux hypérémiés et des petits épanchements sanguins; en comparant ces trois couches chez le cobaye immunisé et non immunisé, nous avons pu constater que la couche formée de globules de pus était plus épaisse chez le premier que chez le second cobaye.

La réaction leucocytaire locale est donc plus accusée chez le cobaye immunisé, ce qui correspond parfaitement au résultat obtenu dans les expériences sur les yeux des lapins. En outre, cette corrélation s'est manifestée dans l'état même des leucocytes qui sont généralement moins désagrégés chez les cobayes immunisés que chez ceux qui ne le sont pas.

Environ trois jours après l'infection, on observe que la fausse membrane est en grande partie détachée de l'organisme le long de la couche la plus infiltrée par les leucocytes. Ainsi, dans la

cavité de la vulve, on aperçoit les parties séquestrées de la muqueuse dans laquelle la pullulation de bacilles diphtériques se poursuit sans encombre. Les surfaces ulcérées de la vulve sont couvertes de globules de pus et de bacilles diphtériques. La différence entre le cobaye immunisé et non immunisé, à cette période du processus diphtérique, consiste dans le seul fait que les leucocytes du premier conservent toutes les propriétés des cellules vivantes, tandis que chez le cobaye témoin nous trouvons une masse de leucocytes désagrégés. Dans le premier cas, les bacilles ne pénètrent pas profondément dans le tissu, et sont arrêtés par les phagocytes à la surface de l'ulcère, tandis que, chez le cobaye non immunisé, ils pénètrent sans entraves dans les couches plus profondes.

Bien que généralement nous ayons rencontré peu de phagocytes, on en trouve cependant plus chez le cobaye immunisé que chez celui qui ne l'est pas.

Il résulte des faits cités que le processus de la guérison de la diphtérie des muqueuses doit se produire dans l'ordre suivant : réaction leucocytaire locale; séquestration de la muqueuse infectée et nécrosée; et ensuite activité phagocytaire des leucocytes défendant l'organisme contre les infections plus profondes et secondaires ; mais le principal procédé par lequel l'organisme se débarrasse des bacilles diphtériques, a un caractère purement mécanique aussitôt que la membrane s'est détachée. Il nous semble donc que la condition importante de la guérison du processus diphtérique local consiste, notamment, dans la formation rapide de l'inflammation circonscrite, et dans une grande accumulation des leucocytes, qui produisent l'histolyse. En l'année 1891, M. *Leber* (18) a de nouveau appelé l'attention sur le rôle des leucocytes dans la production de l'histolyse à l'aide des ferments digérants et dissolvants des tissus. Il ressort aussi des recherches tout récemment publiées par M. *Berestnew*[19] que le sang même riche en globules blancs, comme celui des malades leucocythémiques, manifeste ce pouvoir au plus haut degré. Étant donné ce rôle des leucocytes, il serait intéressant de déterminer quelle est son importance chez les animaux immunisés et non immunisés. Nous espérons continuer les expériences commencées dans cette direction, car elles peuvent nous expliquer pourquoi les membranes des

diphtériques, solidement fixées à la muqueuse infectée, se détachent parfois avec une surprenante rapidité.

En terminant l'exposé de ces recherches cliniques et expérimentales, nous croyons devoir noter les principaux résultats suivants :

1° La leucocytose du sang dans la diphtérie a un caractère particulier qui la distingue de la leucocytose observée dans la plupart des autres maladies infectieuses ;

2° La leucocytose progressive dans la diphtérie donne un mauvais pronostic, et l'analyse du sang peut fournir des indications utiles sur la valeur du traitement ;

3° Les bacilles diphtériques dans l'organisme même sont détruits par l'activité phagocytaire des leucocytes ;

4° Les bacilles diphtériques des infections superficielles, par exemple, des muqueuses, sont enlevés de l'organisme infecté d'une façon mécanique, et il n'y a qu'une petite partie des bacilles qui subisse la destruction phagocytaire après décollement de la fausse membrane ;

5° La propriété nécrotisante du virus diphtérique, qui s'étend à toutes les cellules de l'organisme, entrave l'activité phagocytaire ;

6° Le sérum thérapeutique rend les cellules de l'organisme moins sensibles à l'action nécrotisante du virus diphtérique.

Le présent travail m'a été proposé par M. *E. Metchnikoff*, et je suis très heureux de pouvoir témoigner ma profonde gratitude à mon vénéré et cher maître pour le précieux concours qu'il a bien voulu me prêter pendant mes recherches.

APPENDICE

A. *Observations cliniques sur la marche de la leucocytose chez les malades diphtériques.*

Les cas d'observation cités n'ont pas été l'objet d'un choix spécial, et comme le diagnostic bactériologique ne pouvait être connu que dans les 24 heures, on a eu à constater sur 14 malades un cas de croup d'origine non diphtérique. Sur ces 14 malades, 10 ont été soignés au sérum thérapeutique à l'hôpital des Enfants-Malades, les 4 autres malades, à l'hôpital Trousseau, n'ont été soumis à aucun traitement spécifique.

Le nombre des globules rouges (E) et blancs (L) du sang a été déterminé par le compteur Thoma-Zeiss, la quantité d'hémoglobine (H) par l'appareil Gowers.

I. J. D. 5 ans. — *Diphtérie du pharynx et du larynx.*

1/VI. E = 4,510,000. 20 c. c. de sérum.
L = 15,830.
H = 75 0/0.
2/VI. E = 4,530,000. 10 c. c. de sérum.
L = 8,000.
H = 80 0/0.
3/VI. E = 5,350,000.
L = 11,000.
H = 84 0/0.
4/VI. E = 5,020,000. 10 c. c. de sérum.
L = 11,300.
H = 84 0/0.
5/VI. L = 9,200.

II. G. L. 5 ans 1/2. — *Diphtérie du pharynx.*

1/VI. E = 3,600,000. 20 c. c. de sérum.
L = 22,700.
H = 75 0/0.
2/VI. E = 3,975,000. 20 c. c. de sérum.
L = 12,200.
H = 60 0/0.
3/VI. E = 4,275,000.
L = 11,900.
H = 72 0/0.
4/VI. E = 4,150,000. 20 c. c. de sérum.
L = 9,370.

H = 72 0/0.
5/VI. L = 10,000.

III. A. R. 4 ans. — *Diphtérie du pharynx*.

4/VI. E = 4,750,000. 20 c. c. de sérum.
L = 11,450.
H = 84 0/0.
5/VI. E = 5,100,000. 20 c. c. de sérum.
L = 10,400.
H = 82 0/0.
6/VI. E = 4,770,000.
L = 12,000.
H = 80 0/0.

IV. M. J. 5 ans. — *Diphtérie du pharynx*.

Trachéotomie le 6/VI.
7/VI. 6 h. s. E = 4,000,000. 20 c. c. de sérum.
L = 25,000.
H = 90 0/0.
8/VI. 10 h. m. E = 4,025,000. Complication de scarlatine.
L = 20,220.
H = 90 0/0.

V. H. E. 3 ans. — *Diphtérie du larynx*.

Trachéotomie dans la nuit du 6 au 7/VI.
7/VI. 6 h. s. E = 4,350,000. 20 c. c. de sérum.
L = 15,000.
H = 80 0/0.
8/VI. 10 h. m. E = 4,800,000.
L = 13,750.
H = 85 0/0.

VI. A. V. — *Diphtérie du pharynx*.

9/VI. 6 h. s. E = 4,210,000. 20 c. c. de sérum à 6 h. 30 s.
L = 20,800.
10/VI. 10 h. m. E = 4,470,000. 10 c. cm. de sérum à 4 h. 30 m.
L = 16,600.
6 h. 30 m. E = 4,950,000.
L = 10,600.

VII. E. F. 7 ans. — *Diphtérie du pharynx*.

9/VI. 20 c. c. de sérum.
10/VI. 11 h. m. E = 5,070,000. 20 c. c. de sérum à 4 h. 30 m.
L = 24,000.
H = 95 0/0.
6 h. s. L = 20,800.

VIII. C. 2 1/2 ans. — *Diphtérie du pharynx*.

10/VI 10 h. m. E = 4,320,000. 20 c. c. de sérum à 4 h. 30 m.
L = 29,500.

H = 78 0/0.
6 h. s. E = 4,375,000.
L = 31,300.
H = 80 0/0.
12/VI. Mort.

IX. I. S. 2 ans. — *Croup dans le larynx sans bacilles de Klebs-Löffler.*
16/VI. 9 h. 30 m. E = 4,520,000. 20 c. c. de sérum à 11 h. 45 m.
L = 12,500.
5 h. 15 s. E = 5,500,000. Le malade est à l'état d'asphyxie. Immédiatement après l'examen du sang on a fait la trachéotomie. Guérison.
L = 37,5000.

X. L. B. 7 ans. — *Diphtérie du pharynx.*
15/VI. 20 c. c. de sérum.
16/VI. 10 h. m. E = 5,400,000. 10 c. c de sérum à 11 h. 45 m.
L = 22.000.
H = 93 0/0.
5 h. 15 m. s. E = 5,000,000.
L = 15,000.
H = 90 0/0.

XI. E. B. 6 ans. — *Diphtérie du phargnx.*
4me jour de maladie; les ganglions cervicaux très gonflés. T° 37,7 — 38,0. Guérison,
22/VI. L = 16,600.
23/VI. L = 14,800.
24/VI. L = 10,600.

XII. M. C. 9 ans. — *Diphtérie du pharynx.*
Les ganglions cervicaux sont gonflés; 3me jour de maladie; t° 37,9 — 38,0. Guérison.
22/VI. L = 20.000.
23/VI. L = 12,500.
24/VI. L = 12.000.
25/VI. L = 9.400.

XIII. J. C. 4 ans. — *Diphtérie du pharynx.*
Les ganglions cervicaux sont gonflés; t° 37,5 — 38,0. Mort.
22/VI. L = 38,000.
23/VI. L = 43,000.
24/VI. L = 42,700.
25/VI. Mort.

XIV. M. D., 8 ans. — *Diphtérie du pharynx et de la cavité buccale.*
8me jour de maladie; t° 38,6 — 40,0. Mort.
23/VI. L = 40,000.
24/VI. L = 34,100. On a fait la trachéotomie le soir.
26/VI. Mort.

B. — *Observations sur la leucocytose des lapins diphtériques. Expériences sur le traitement curatif et préventif de la diphtérie.*

I. 23/VII. A trois lapins, pesant 1,870, 1,820 et 1,950 grammes, on a fait à 8 h. 30 du matin une injection sous-cutanée, à chacun, de 5 c. c. de culture diphtérique dans du bouillon, et à 11 h. 30 m., on a injecté, en outre, aux deux premiers lapins, 0,5 de sérum; le 3[me] était comme témoin. Nous citons les résultats de l'analyse quotidienne du nombre des leucocytes du sang (L). et de la température (T), dans la table suivante:

	1er lapin.		2e lapin.		Lapin témoin.	
Temps.	L.	T.	L.	T.	L.	T.
22/VII 4 h. s.	11,000	39,3	11,800	39,4	9,100	38,9
23/VII 8 h. 30 m. m.	Injection de 0,5 c. c de culture de bac. diphtér.					
11 h. 30 m. m.	8,300	39,7	7,300	39,6	12,500	39,5
	injection de 0,5 c. c. de sérum.					
5 h. s.	12,000	40,2	8,300	40,0	14,000	40,3
24/VII 8 h. 30 m. m.	11,800	39,3	9,400	39,7	12,800	39,3
5 h. s.	13,500	39,8	11,500	39,0	23,700	39,3
25/VII 8 h. 30 m. m.	12,600	39,7	11,400	39,6	30,000	37,8
5 h. s.	17,900	39,8	15,000	39,5	36,600	36,0
26/VII 8 h. m.	17,700	39,2	13,500	39,6	Mort	
5 h. s.	14,800	39,7	8,500	39,8		
27/VII 8 h. m.	17,700	39,2	10,800	39,5		
28/VII 8 h. m.	17,800		9,600			
29/VII 8 h. m.	15,200		10,000			
30/VII 8 h. 30 m.	11,100		9,700			

Remarque. L'augmentation du nombre des leucocytes, depuis le 25/VII, chez les deux premiers lapins, s'explique par l'inflammation à l'endroit de l'injection de la culture et ensuite du sérum. Une partie de la peau est nécrosée.

II Dans l'expérience suivante, le sérum thérapeutique est injecté 7 heures après l'infection. Injections répétées du sérum. Poids des lapins: 1,875, 1,885, 1,745 et 1,800 grammes.

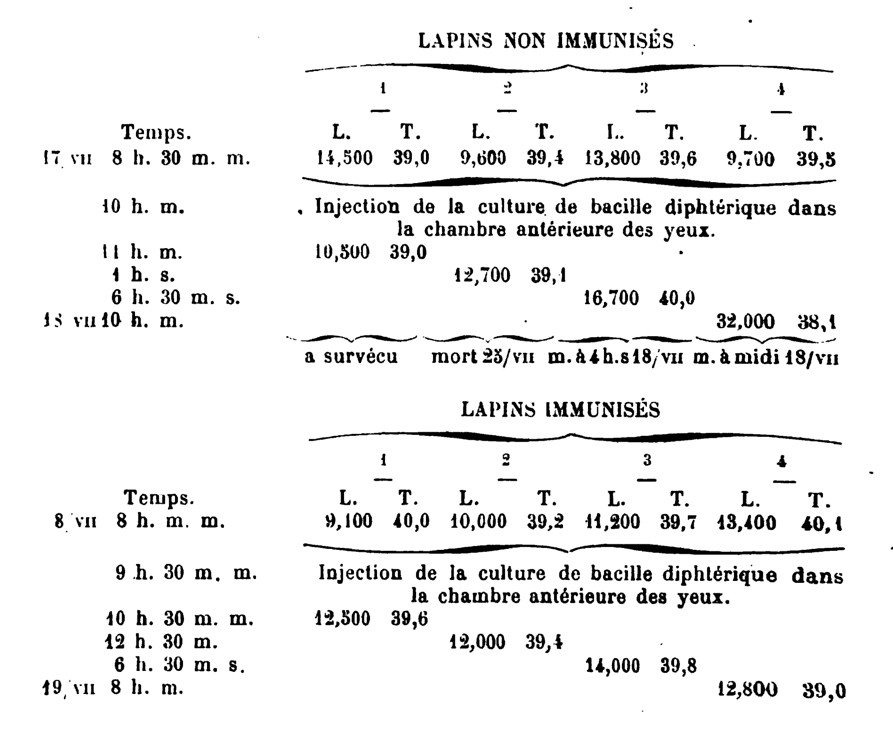
	1er lapin.		2e lapin.		3e lapin.		Lapin témoin.	
Temps.	L.	T.	L.	T.	L.	T.	L.	T.
25/VI 4 h. 30 m. s.	5,000	38,6	7,300	39,0	10,000	38,9	9,000	38,8
26/VI 8 h. 30 m. m.	injection de la culture diphtér., 0,5 c. c., aux lapins.							
3 h. 30 m. s.	14,000	38,8	12,000	39,2	13,100	39,1	10,000	38,8
	Injection de 0,5 c. c. de sérum.							
8 h. 30 m. s.	14,000	38,8	19,000	39,3	18,700	39,2	16,200	38,8
27/VI 8 h. 30 m. m.	17,000	38,3	14,100	38,5	18,000	38,2	18,700	38,4
8 h. 30 m. s.	10,000	38,4	9,100	38,8	12,000	38,2	19,100	40,1
28/VI 8 h. 30 m. m.	14,500	38,6	10,000	39,0	16,200	38,2	26,600	39,5
29/VI 8 h. 30 m. m.	19,500	38,0	12,000	39,2	35,200	37,0	20,000	39,3
	inject. de 0,5 c. c. de sérum.				Morts en 2-3 heures.			
30/VI 8 h. m.	22,900	37,8	11,400	39,4				
1/VII 8 h. 30 m. m.	22,500	36,0	8,200	39,5				
	Mort							

III. L'influence de l'injection préventive du sérum sur le nombre des leucocytes du sang ressort de l'expérience suivante sur les 4 lapins, dont le poids était de 1.770, 1,780, 1,770 et 1,750 grammes.

	1er lapin.		2e lapin.		1er lapin témoin.		2e lapin témoin.	
Temps.	L.	T.	L.	T.	L.	T.	L.	T.
14/VII 10 h. m.	7,500	39,5	10,000	39,5	5,800	39,5	7,600	39,7
11 h. 45 m. m.	Inj. de 0,5 c. c. de sérum.							
3 h. s.	10,000	39,8	13,300	39,8	10,040	39,8	9,800	40,0
8 h. s.	11,250	40,4	18,500	39,8	10,800	39,6	8,300	40,0
15/VII 8 h. m.	11,500	39,7	15,800	39,2	9,150	39,5	8,700	39,9

C. — *Recherches sur la réaction leucocytaire et sur la phagocytose après l'injection de la culture des bacilles diphtériques dans la chambre antérieure des yeux des lapins.*

I. La description générale de ces expériences a déjà été faite dans le mémoire. Pour faciliter l'examen du sang, on a pris d'abord 4 lapins non immunisés, pesant 1,620, 1,670, 1,770 et 1,750 grammes, et ensuite, dans la seconde partie de l'expérience, on a fait le même examen sur 4 lapins immunisés, pesant 1,770, 1.530, 1,780 et 1,530 grammes.



LAPINS NON IMMUNISÉS

	1		2		3		4	
Temps.	L.	T.	L.	T.	L.	T.	L.	T.
17/VII 8 h. 30 m. m.	14,500	39,0	9,600	39,4	13,800	39,6	9,700	39,5
10 h. m.	Injection de la culture de bacille diphtérique dans la chambre antérieure des yeux.							
11 h. m.	10,500	39,0						
1 h. s.			12,700	39,1				
6 h. 30 m. s.					16,700	40,0		
18/VII 10 h. m.							32,000	38,1
	a survécu		mort 23/VII		m. à 4 h. s 18/VII		m. à midi 18/VII	

LAPINS IMMUNISÉS

	1		2		3		4	
Temps.	L.	T.	L.	T.	L.	T.	L.	T.
8/VII 8 h. m. m.	9,100	40,0	10,000	39,2	11,200	39,7	13,400	40,1
9 h. 30 m. m.	Injection de la culture de bacille diphtérique dans la chambre antérieure des yeux.							
10 h. 30 m. m.	12,500	39,6						
12 h. 30 m.			12,000	39,4				
6 h. 30 m. s.					14,000	39,8		
19/VII 8 h. m.							12,800	39,0

ANALYSE MICROSCOPIQUE DES COUPES DES YEUX ÉNUCLÉÉS

Au bout d'une heure.

Lapin non immunisé. — Sur la surface antérieure de l'iris on aperçoit par-ci par-là des bacilles à l'état libre. Commencement de l'exsudation fibrineuse et émigration des leucocytes du sang ; pas de leucocytes dans la chambre antérieure de l'œil.

Lapin immunisé. — On trouve des bacilles libres à la surface de l'iris ; exsudation fibrineuse; on remarque dans quelques endroits, près des grumeaux de bacilles, de petits amas de leucocytes.

Au bout de trois heures.

Lapin non immunisé. — L'exsudation purulente couvre presque toute la surface de l'iris tournée vers la chambre antérieure. Les vaisseaux de l'iris sont hypérémiés. Émigration des leucocytes. Les phagocytes sont disséminés le long de la couche de l'exsudation, mais on observe encore beaucoup de bacilles libres.

Lapin immunisé. — Le caractère général du tableau est le même que dans le cas précédent, mais il y a moins de bacilles libres.

Au bout de huit heures.

Lapin non immunisé. — La phagocytose atteint le maximum de son développement, mais en même temps le nombre des bacilles diphtériques augmente aussi ; plusieurs leucocytes ou phagocytes sont nécrosés.

Lapin immunisé. — La phagocytose atteint le dernier stade de son développement. Dans un grand nombre de cellules on n'observe que des restes de bacilles modifiés dans leur forme et dans leur coloration. Point de bacilles libres. La désagrégation des leucocytes est plus faible que celle du lapin non immunisé. Le tissu de l'iris est fortement infiltré de globules de pus.

Au bout de vingt-quatre heures.

Lapin non immunisé. — Nécrose de presque tous les leucocytes et commencement de la nécrose de l'iris qui est infiltré de leucocytes à un faible degré. On observe une masse de bacilles diphtériques sur la surface antérieure et postérieure de l'iris. Sur cette dernière, on rencontre beaucoup de phagocytes normaux.

Lapin immunisé. — Nécrose complète de la chambre antérieure de l'œil, avec l'iris et avec tous les éléments cellulaires. L'œil n'a pas été énucléé, parce que toute la partie antérieure de l'œil a été séquestrée. Les bacilles libres s'observent au milieu des foyers purulents contenant les leucocytes désagrégés en une masse granuleuse.

II. Cette expérience a dû être faite sur six lapins, mais l'un d'eux est mort d'une cause inconnue, de sorte que la leucocytose générale et les phénomènes anatomo-pathologiques de l'œil n'ont pu être observés que sur quatre lapins, 3 et 24 heures après l'injection des yeux. Les lapins pesaient : 1.710, 1.750, 1,600 et 1,450 grammes.

	LAPINS NON IMMUNISÉS				LAPINS IMMUNISÉS			
	1		2		3		4	
Temps.	L.	T.	L.	T.	L.	T.	L.	T.
9/VII 10 h. m. m.	12,000	39,5	12,000	39,6	11,200	39,2	10,800	39,0
11 h. m. m.					inject. de 0,5 c. c. de sérum			
10/VII 8 h. 30 m. m.	Injection de la culture de bacille diphtérique dans la chambre antérieure des yeux.							
11 h. 30 m.	12,500	39,0			17,000	39,2		
11/VII 8 h. 30 m. m.			19,800	36,0			8,500	39,1
	mort 14/VII		mort à 1 h. 11/VII					

ANALYSE MICROSCOPIQUE DES COUPES DES YEUX ÉNUCLÉÉS

Au bout de trois heures.

Lapin non immunisé. — L'exsudation purulente s'est formée sur la surface de l'iris; infiltration leucocytaire du tissu même de l'iris. Phagocytose; mais la plus grande partie des bacilles diphtériques est libre.

Lapin immunisé. — L'infiltration leucocytaire de l'iris et l'agglomération des leucocytes dans la chambre antérieure sont plus accusées que chez le lapin non immunisé. La phagocytose est considérable, bien que l'on observe encore des bacilles libres.

Au bout de vingt-quatre heures.

Lapin non immunisé. — Les leucocytes, dans la chambre antérieure de l'œil, sont détruits; on n'y aperçoit pas de bacilles. Des foyers de phagocytes sur la surface postérieure de l'iris, dont quelques-uns commencent à se nécroser; on trouve peu de bacilles libres. La partie antérieure de l'œil s'est détachée sans opération à cause de la nécrose.

Lapin immunisé. — La chambre antérieure offre la même nécrose complète des leucocytes. L'iris est fortement infiltré de leucocytes, mais il n'est pas nécrosé. Point de bacilles diphtériques dans l'œil.

III. L'expérience suivante avait été faite sur six lapins, dont trois ont été immunisés avec 5 c. c. de sérum, trois jours d'avance. Le poids des lapins non immunisés est de: 1,700, 1,680 et 1,715 grammes; celui des lapins immunisés, de 1,570, 1.700 et 1,680 grammes.

	LAPINS NON IMMUNISÉS					
	1		2		3	
Temps.	L.	T.	L.	T.	L.	T.
17/VII 9 h. m.	12,500	39.1	10,000	39,5	9,000	39,3
18/VII 8 h. 30 m. m.	Injection de la culture de bacille diphtérique dans la chambre antérieure des yeux.					
11 h. 30 m.	12,500	39,0				
5 h. s.			16,000	39,6		
19/VII 8 h. 30 m. m.					16,600	38,8
	mort 21/VII		mort 20/VII		mort 20/VII	

	LAPINS IMMUNISÉS					
	1		2		3	
Temps.	L.	T.	L.	T.	L.	T.
17/VII 8 h. 30 m. m.	12,500	39,4	10,800	38,8	7,000	39,5
18/VII 8 h. 15 m. m.	Injection de la culture de bacille diphtérique dans la chambre antérieure des yeux.					
11 h. 15 m. m.	13,800	39,1				
4 h. 30 m.			23,000	39,1		
19/VII 8 h. 30 m.					9,100	39,0

ANALYSE MICROSCOPIQUE DES COUPES DES YEUX ÉNUCLÉÉS

Au bout de trois heures.

Lapin non immunisé. — La réaction leucocytaire est considérable, la phagocytose l'est aussi, mais on observe une grande quantité de bacilles libres.

Lapin immunisé. — On voit plus de leucocytes que chez le lapin non immunisé, et tous les bacilles sont contenus dans les phagocytes.

Au bout de huit heures.

Lapin non immunisé. — Malgré la phagocytose très considérable, il y a beaucoup de bacilles diphtériques libres. Les leucocytes et les phagocytes ont déjà, en partie, subi la nécrose.

Lapin immunisé. — Peu de bacilles diphtériques, ils sont tous contenus dans les phagocytes. La réaction leucocytaire de ce cas est généralement insignifiante.

Au bout de vingt-quatre heures.

Lapin non immunisé. — Destruction complète des leucocytes; peu de bacilles libres. La chambre antérieure est nécrosée; elle s'est détachée sans opération.

Lapin immunisé. — Peu de leucocytes nécrosés, tout l'iris est infiltré de leucocytes. Point de bacilles diphtériques.

D. — *Expériences qui démontrent que les bacilles diphtériques contenus dans les phagocytes sont vivants et virulents, et que les humeurs des lapins immunisés n'ont pas de propriétés bactéricides.*

I. 17/VII. 9 h. m. Une injection sous-cutanée de 5 c. c. de sérum a été faite à un lapin; le 18/VII, à 8 h. 30 m. du matin, on a injecté, dans la chambre antérieure de l'œil, une épaisse émulsion de bac. diphtérique, comme on l'avait fait dans les expériences de la précédente série. A 8 h. 30 m. du soir, on a retiré de la chambre antérieure de l'œil infecté toute l'humeur aqueuse, dont on a injecté 1 c. c. à un cobaye pesant 320 grammes.

Les expériences précédentes ayant démontré que, chez les lapins immunisés, tous les bacilles sont contenus dans les phagocytes au bout de 8 heures, on pouvait s'attendre, à plus forte raison, qu'il n'y a pas de bacilles libres dans l'œil 12 heures après l'infection. Le cobaye est mort 4 jours après.

Avec la même humeur de l'œil, on a préparé une culture dans du bouillon. Deux jours après, on en a obtenu une culture pure de bacilles diphtériques qui, après avoir été injectée, le 20/VII, en quantité de 1 c. c. à un cobaye, pesant 300 grammes, l'a tué en 48 heures. Cette expérience a été répétée, elle a donné le même résultat.

II. 30/VII. Deux lapins ont été immunisés chacun par 1 c. c. de sérum.

31/VII. A ces deux lapins immunisés, et à deux lapins témoins on a retiré, au moyen de tubes stérilisés, l'humeur aqueuse des yeux, et ces quatre tubes ont été ensemencés avec une petite quantité de culture du bacille diphtérique.

1/VIII. On a obtenu, dans les 4 tubes, une culture pure de bacilles diphtériques. Deux de ces cultures, une d'un lapin immunisé, et l'autre d'un lapin non immunisé, ont été injectées en quantité de 0,2 c. c. à deux cobayes de 410 et 480 grammes.

3/VIII. Le cobaye (de 480 grammes) est mort à la suite de l'injection de la culture provenant d'un lapin immunisé.

4/VI. L'autre cobaye (de 410 grammes) est aussi mort. Par conséquent, la virulence des bacilles diphtériques s'est accrue dans l'humeur de l'œil du lapin immunisé.

1/VIII. Des 4 cultures de bacilles diphtériques obtenues, le 1/VIII, dans l'humeur aqueuse des yeux des lapins, on a ensemencé du bouillon et de la gélose.

2/VIII. La culture des bacilles diphtériques provenant des lapins immunisés est plus abondante que celle des lapins témoins. Des injections sous-cutanées de cultures provenant d'un lapin immunisé et de deux lapins non immunisés ont été faites à trois cobayes.

3/VIII. Entre 10 et 11 heures du matin sont morts les deux cobayes infectés avec des cultures provenant des lapins immunisés. Le troisième cobaye témoin est mort 5 heures après les deux premiers.

L'expérience a été répétée avec 4 autres lapins et elle a donné les mêmes résultats.

En outre, on a ensemencé le sérum du sang des lapins immunisés et non immunisés avec des bacilles diphtériques, et, au bout de 24 heures, on a obtenu une culture plus abondante sur le sérum des lapins immunisés.

LITTÉRATURE

1. Vaillard et Vincent, Contribution à l'étude du tétanos. (*Annales de l'Institut Pasteur*, n° 1, 1891.)

2. Cantacuzène (J.), *Recherches sur le mode de destruction du vibrion cholérique dans l'organisme*. Paris, 1894.

3. Kikodzé, *L'anatomie pathologique du sang dans l'inflammation fibrineuse des poumons*. Thèse de doctorat, en russe. Saint-Pétersbourg, 1890.

4. Jaksch, *Centralblatt für klinische Medicin.*, n° 5, 1892.

5. Rieder, *Münch. medic. Wochenschrift*, n° 511, 1892.

6. Tchistovitch, Sur la quantité des leucocytes du sang dans les pneumo-

nies fibrineuses à issue mortelle. (*Arch. des sciences biologiques*, nº 5. J. II. 1893.)

7. Loeffler, *Mittheilungen aus dem Kaiserl. Gesundheitsamte*. Bd. II, S. 464.

8. Ruffer, A. Preliminary note on the processes taking place in the diphteritic membrane. (*British med Journal*, July 26, p. 202, 1890.

9. Massart (J.), Le chimiotaxisme des leucocytes et l'immunité. (*Annales de l'Institut Pasteur*, p. 326, 1892.)

10. Bardach, *Recherches sur la diphtérie*, thèse russe, Moscou, 1894.

11. Kutscher, Der Nachweiss der Diphtericbacillen in den Lungen mehrerer an Diphterie verstorbener Kinder, *Zeitschrift für Hygiene und Infections-Krankheilten*. Bd. XVIII, H. I, 1894.

12. Morel (Charles), *Contribution à l'étude de la diphtérie*. Paris, 1891.

13. Oertel, Ueber das diphteritische Gift und seine Wirkungsweise. (*Deutsch. medic. Woch.* Nº 45, 1890.)

14. Chateney (G.), *Les réactions leucocytaires vis-à-vis de certaines toxines végétales et animales*. Paris, 1894.

15. Samoiloff, 1. Beiträge zür Kenntniss des Verhaltens des Eisens in thierischen Organismus; 2. Ein Beitrag zür Pharmakologie des Silbers. (*Arbeiten des Pharmakologischen Institutes zü Dorpat*, IX, 1893.)

16. Lipski, Ueber die Ablagerung aus Ausscheidung des Eisens aus dem thierischen Organismus. (*Ibidem.*)

17. Gabritschewsky, Mikroskopische Untersuchungen ueber Glycogenreaction im Blut. (*Arch. fur Experim. Pathologie und Pharmacologie*. T. XXVIII.)

18. Leber, *Die Entstehung der Entzundung und die Wirkung der entzundungserrengeden Schädlichkeiten*. Leipzig, 1891.

19. Berestnew, Des propriétés fermentatives du sang et du pus. (*Arch. des sciences biologiques*, nº 1, p. III, 1894.)

EXPLICATION DE LA PLANCHE XIII.

1. Coupe de la partie antérieure de l'œil du lapin non immunisé, 8 heures après l'infection (C. i.).
2. Coupe de la partie antérieure de l'œil du lapin immunisé (C. i.).
3. Coupe de la partie antérieure de l'œil du lapin non immunisé. 24 heures après l'infection (C. i.).
4. Coupe de la partie antérieure de l'œil du lapin immunisé (C. iii).

Pour la description détaillée de ces coupes, voir l'Appendice (C. i-iii).

ACTION DE LA BACTÉRIDIE CHARBONNEUSE

SUR UN POISSON MARIN, L'HIPPOCAMPE

PAR MM. SABRAZÈS ET COLOMBOT

Pendant le cours des années 1893 et 1894, nous avons pu, grâce à la bienveillante hospitalité que nous a accordée à la Station zoologique d'Arcachon M. le professeur Jolyet, expérimenter sur les animaux marins l'action de la bactéridie charbonneuse.

Les recherches de cet ordre exigent de grandes précautions. Nous nous sommes d'abord efforcés de placer nos animaux dans d'excellentes conditions de vie. Ils étaient isolés dans de vastes aquariums où l'eau de mer se renouvelait sans cesse, et qui constituaient un habitat compatible avec des observations très prolongées.

Pour éviter les infections secondaires, qui auraient pu fausser nos résultats, nous avons vérifié, par l'examen direct et par la culture, la stérilité du sang et des divers organes de l'hippocampe, choisi, de propos délibéré, comme sujet d'étude[1]. L'épiderme et le revêtement intestinal de ce poisson osseux ont une épaisseur relativement considérable, et paraissent s'opposer normalement à la pénétration des bactéries[2].

Il n'existe dans le sang de ce lophobranche qu'un très petit nombre de globules blancs, représentés par des lymphocytes et par des leucocytes mononucléaires; on n'observe pas de leucocytes polynucléaires. Nous avons vainement cherché la rate avec l'aide de M. Phisalix.

A première vue, il semblait donc en être de l'hippocampe comme de certains crustacés, chez lesquels « la faiblesse de

1. Le genre Hippocampe comprend deux espèces déterminées par Cuvier; elles ne diffèrent que par des détails de morphologie extérieure peu importants. Nous avons indistinctement opéré sur ces deux espèces, qui se rencontrent à Arcachon.

2. L'hippocampe n'est cependant pas absolument dépourvu de parasites : à la surface du foie et des reins il n'est pas rare de rencontrer des kystes, qui sont de nature psorospermique.

la protection phagocytaire se trouve très probablement en relation avec l'épaisseur des parois cuticulaires qui revêtent non seulement toute la surface extérieure, mais aussi l'intestin[1] ».

L'hippocampe est, de plus, un animal très vivace, capable de s'accommoder de conditions extérieures précaires. Il peut séjourner, pendant plusieurs jours, dans des récipients étroits et mal aérés, supporter pendant une semaine des températures de 30° à 32°. Il devenait intéressant de rechercher quels sont les moyens de défense qu'il met en œuvre pour résister aux virus.

Nous étions d'autant plus enclins à opérer sur l'hippocampe que ce poisson constitue, vis-à-vis des infections, un réactif des plus sensibles. Grâce au jeu de ses chromatophores, il traduit en effet son état morbide par des phénomènes de dépigmentation très visibles, passagers ou permanents, suivant que l'action exercée sur lui, par les agents étrangers, est plus ou moins nocive.

La bactéridie charbonneuse a été choisie de préférence aux autres microbes, parce qu'elle est facile à reconnaître, à cultiver, et qu'elle convient admirablement pour l'appréciation des degrés de virulence.

Nous avons adopté, comme porte d'entrée, le tissu cellulaire de la queue et la cavité générale, plutôt que les voies digestives, qui sont difficilement accessibles.

L'infection directe des aquariums ne nous a pas semblé devoir être réalisée, en raison du pouvoir bactéricide de l'eau de mer.

Les plus grandes précautions d'asepsie étaient régulièrement prises. Nous opérions par piqûre à l'aide d'une seringue à piston d'amiante stérilisée par la chaleur. Toutes les fois que nous pratiquions une inoculation, nous injections à des témoins, dans les mêmes régions, des quantités égales d'eau stérilisée ou de bouillon de bœuf peptonisé, pur de tout germe. Un demi-centimètre cube des cultures, en bouillon, datant de deux jours, que nous avons utilisées, tuait un lapin du poids d'un kilogramme en 34 heures.

1. *Elie Metchnikoff*, Leçons sur la pathologie comparée de l'Inflammation, 1892, p. 103.

Il fallait se préoccuper tout d'abord d'établir quelle était l'influence des bouillons stériles, des différentes doses du virus utilisé, de la température sur la résistance de l'hippocampe.

L'inoculation sous la peau d'un centimètre cube de bouillon de bœuf peptonisé n'ayant pas encore servi à la culture est inoffensive. Les bouillons charbonneux, débarrassés de tout germe par filtration à la bougie Chamberland, sont mortels, dans un délai de 24 heures, à la dose d'un centimètre cube.

Ces constatations préliminaires témoignent donc de la nocuité des virus plutôt que des véhicules employés.

Si nous envisageons maintenant, sans entrer dans le détail minutieux de chacune des expériences, l'ensemble de nos inoculations successives, nous voyons s'affirmer ce fait intéressant d'une bactérie, virulente au premier chef pour un certain nombre d'animaux à sang chaud, qui exerce ses propriétés pathogènes sur un poisson de mer, sans qu'on soit obligé d'élever artificiellement la température du milieu ambiant. Pendant la durée de nos recherches, le thermomètre a oscillé entre 26° et 14° cent.

L'organisme des hippocampes, qui ont succombé à l'inoculation le 12 et le 15 septembre, est infiltré de bactéridies au même titre qu'une souris ou qu'un lapin charbonneux.

La maladie évolue en huit jours lorsque la quantité de bouillon inoculé ne dépasse pas un quart de c. c. l'injection étant faite dans le tissu cellulaire sous-cutané, en six jours quand la même quantité est introduite dans la cavité générale. La porte d'entrée du virus influe donc sur la marche de l'infection.

La quantité et la qualité des germes inoculés ont aussi leur importance.

Des spores, insérées à dose massive sous la peau de l'hippocampe, se développent sans retard et sont le point de départ d'une infection mortelle à brève échéance.

En faisant pénétrer dans les tissus un demi-centimètre cube de bouillon virulent, on provoque, si on élève artificiellement à 28° la température du milieu, une mort quasi foudroyante par intoxication.

Tel est le résultat brut de nos expériences; il soulève des problèmes d'une interprétation délicate, relatifs aux réactions réciproques de l'organisme de l'hippocampe d'une part, de la bactéridie charbonneuse d'autre part.

Si on sacrifie les animaux à intervalles réguliers, on voit clairement que les microbes déposés dans le tissu cellulaire émigrent bientôt dans les divers organes. 30 heures après l'inoculation, on en trouve dans le foie, les branchies, les reins ; le sang du cœur présente des phagocytoses. Au bout de 60 heures, on ne retrouve guère des bactéridies qu'au point d'inoculation ; leur nombre est relativement peu élevé par rapport à la dose injectée ; il existe une infiltration leucocytique manifeste.

Les bactéridies libres sont *tout à fait normales*. Leur nombre diminuant d'une façon progressive, il semblerait *a priori* qu'elles dussent finir par disparaître, après s'être comportées comme des hôtes absolument inoffensifs pour les animaux en expérience.

Mais qu'on les reprenne par la culture : on s'aperçoit que leur passage dans les humeurs de l'hippocampe, loin de les avoir atténuées, les a renforcées, puisqu'un lapin du poids de 1,150 grammes succombe, toutes choses égales, trente heures après leur inoculation.

Ce virus, partiellement détruit, est donc encore représenté par des bactéridies dépositaires de sa virulence, capables de se multiplier, d'engendrer ultérieurement des générations nouvelles que des sélections successives rendent plus vivaces. Bien plus, l'expérience prolongée démontre que ces bactéridies, au lieu de disparaître, s'accroissent et se segmentent avec une telle intensité qu'elles envahissent finalement tout le territoire vasculaire de l'hippocampe. Les coupes des divers organes sont très démonstratives à cet égard.

Quels sont les moyens mis en œuvre par l'animal pour lutter avec avantage contre les premières atteintes de l'infection ?

Dès le début, une heure après l'injection, il est facile de voir des phénomènes de phagocytose dans la région inoculée ; au bout de deux heures, leur nombre a considérablement augmenté ; les bactéries incluses sont légèrement tuméfiées et ne se colorent pas uniformément. A la fin du premier jour, la présence dans le sang de leucocytes qui charrient des bactéridies, et constituent pour elles des agents actifs de dissémination, plaide en faveur d'une lutte d'ordre cellulaire ; sous la peau on surprend aussi des phagocytoses remarquables.

Les humeurs de l'hippocampe ne nous ont pas paru être défavorables *in vivo* au développement du *bacillus anthracis*, puis-

que des spores inoculées le 18 septembre ont produit, dans un bref délai, des filaments. L'aspect normal de la majorité des éléments bactéridiens qui infiltrent les branchies, le foie, les reins, etc., au sixième et au neuvième jour, vient à l'appui de cette assertion.

In vitro, les bactéridies ensemencées dans le sang du cœur et placées sur la platine d'un microscope recouvert d'une cloche opaque s'accroissent et se divisent; les solutions de vésuvine ne les colorent pas en brun foncé. A la vingtième heure, les bactéridies libres mélangées au sang du cœur de l'hippocampe n'ont subi aucune altération appréciable; transportées dans du bouillon, elles prolifèrent abondamment.

On constate un renforcement de la virulence, non seulement après un séjour de 24 à 48 heures du *bacillus anthracis* dans les tissus de l'hippocampe, mais encore au bout d'une semaine, alors que les foyers de multiplication du microbe inoculé encombrent tous les vaisseaux. Nous admettrions la réalité d'un processus de destruction sur place des bacilles charbonneux, sans l'intervention des phagocytes, si l'on trouvait, en dehors des cellules, tous les microbes en voie de dégénérescence.

On pourrait essayer alors, d'après cette hypothèse, d'interpréter par la survie de quelques germes particulièrement résistants, acclimatés à la longue au terrain qui leur était primitivement défavorable, la dissémination et la multiplication ultime du parasite dans les organes.

Un examen minutieux enlève tout crédit à cette interprétation.

Dans les préparations fournies à intervalles plus ou moins espacés, et à partir du début de l'infection, par la sérosité des régions inoculées, un bon nombre de bactéridies libres contrastent par la régularité de leurs contours, la longueur de leurs segments, leur avidité pour les couleurs d'aniline, l'homogénéité de leur coloration, avec les bactéridies englobées qui sont à des stades divers de digestion intracellulaire. Sur les coupes du foie, des branchies, des reins, des parois intestinales, etc., ce contraste apparaît plus éclatant encore.

Quelques faits sembleraient, de prime abord, militer en faveur d'une influence modificatrice prépondérante exercée par les humeurs sur la bactéridie charbonneuse, si on se contentait d'une observation superficielle et incomplète. Dans le sang du cœur de

l'hippocampe inoculé le 6 septembre, et mort spontanément le 15, on rencontre des éléments polyarticulaires, disposés en streptobacilles, voire en streptococci; ils sont mal colorés, inégalement tuméfiés. Leur longueur extrême, qui peut dépasser 50 μ, cadre assez mal, semble-t-il, avec l'hypothèse d'un englobement phagocytaire récent. Ces formes involutives seraient-elles dues à l'action néfaste du plasma sanguin?

La réponse n'est pas aisée. Considérons cependant qu'il existe des éléments tout à fait normaux, en dehors des cellules, à côté des chaînes de bactéridies frappées de déchéance, qu'on trouve en outre des détritus cellulaires plus ou moins cohérents en même temps que des leucocytes volumineux, en voie de désintégration, contenant dans leur intérieur des *chapelets de segments microbiens manifestement altérés.* Parmi ces phagocytes, il en est qui, succombant dans la lutte, s'accumulent dans le sang et s'y débarrassent de leurs parasites. Ceux-ci, profondément modifiés dans leurs propriétés morphologiques, sont encore capables de se multiplier et de donner naissance aux formes bactériennes sus-décrites. A cette période terminale de l'infection, des amas fasciculés de bactéridies normales occupent, dans le foie, les vaisseaux intertrabéculaires et le système porte circonscrit par des bourgeons pancréatiques; dans les reins, les espaces intertubulaires dans les branchies, tout le réseau vasculaire qui est remarquablement injecté. Ces préparations se différencient de celles que l'on obtient avec le sang du cœur où sont, pour ainsi dire, collectés, après la mort, les déchets de la phagocytose.

L'étude de la sérosité péritonéale de l'hippocampe inoculé le 6, mort le 12, soulève des problèmes du même ordre; là encore se pose la question de savoir si les formes d'involution que l'on observe immédiatement après la mort sont dues à l'influence directe de l'exsudat séreux, ou sont la conséquence d'un acte cellulaire. Les bactéridies libres sont, pour la plupart, à divers stades de dégénérescence; quelques-unes ont exceptionnellement une longueur de 50 à 60 μ. Leur *groupement en amas arrondis ouovalaires, leur tassement* incite à supposer qu'elles ont eu primitivement un substratum cellulaire commun. On est d'autant plus enclin à ne pas abandonner cette explication, qu'on retrouve toutes les phases intermédiaires entre ces aggloméra-

tions microbiennes et des phagocytoses multiples d'où elles dérivent. Ces phagocytes sont des éléments cellulaires dont le noyau est tantôt très apparent, tantôt invisible, et dont le protoplasme plus ou moins vacuolaire englobe de nombreux tronçons bactéridiens juxtaposés ou entrecroisés. Même en ces points où la vitalité du virus semblerait compromise, si l'on se bornait à un examen superficiel, on voit des bacilles charbonneux d'aspect normal, et l'ensemencement démontre que, sur les milieux usuels, le microbe colonise activement.

La dissémination précoce des bactéridies, l'existence d'une hyperleucocytose à la période d'état de l'infection et d'un parallélisme entre l'abondance des phénomènes phagocytaires et le nombre des formes bactériennes involutives, la constatation de tous les termes de passage entre les foyers parasitaires groupés étroitement en corps arrondis et l'inclusion de foyers analogues dans l'intimité de cellules susceptibles de succomber à leur tour et de permettre aux parasites inclus de se libérer, constituent de sérieux arguments en faveur du rôle que joue la phagocytose dans l'infection expérimentale de l'hippocampe par le *bacillus anthracis*.

Par contre, les cultures positives *in vitro* dans le sang du cœur, l'intégrité de la bactéridie mise au contact du sérum, la présence, au point d'inoculation, siège d'un empâtement œdémateux, dans le sang et surtout dans les viscères, de segments bactéridiens normaux, longs de 3 à 5 μ, coupés court aux extrémités, bien calibrés, se colorant uniformément et d'une façon intense, enfin la multiplication ultime, dans tous les organes, de bactéridies normales d'une virulence extrême, nous mettent dans l'obligation de considérer comme douteuses les propriétés bactéricides des humeurs chez l'hippocampe.

Le phagocytisme a pour acteurs des leucocytes dont les diamètres mesurent, à l'état physiologique, 12 μ sur 10 μ. Leur noyau (6 μ sur 3 μ), est unique, ovalaire, compact, d'aspect granuleux; il se colore vivement par le bleu de méthylène, tandis que le protoplasme reste incolore ou ne prend qu'une légère teinte bleutée. Ces éléments se retrouvent partout où l'on relève des phénomènes de phagocytose. On les reconnaît généralement à travers leurs modifications morphologiques : ils peuvent en effet se vacuoliser, s'hypertrophier, s'effiler, perdre leur noyau, se désagréger.

Dans le foie, les cellules endothéliales collaborent puissamment à la phagocytose, se transforment en cellules étoilées de Kupffer et en macrophages de grandes dimensions qui emprisonnent des globules rouges, du pigment hématique, des leucocytes, des bactéries dégénérées à segments courts, inégaux, de teinte variable, agglomérés sans ordre.

La mise en jeu de ces moyens de défense coïncide avec une dilatation très accusée des vaisseaux, et s'exerce à la température ambiante de 14° à 26°, à la température artificielle de 28°.

Immédiatement après l'inoculation, les téguments de l'hippocampe subissent une dépigmentation progressive. En examinant la peau par délamination ou sur des coupes histologiques, on voit que ce phénomène est dû à la rétraction des chromatophores qui se condensent isolément en boules plus ou moins espacées, au lieu de former, comme à l'état normal, un enchevêtrement compact, une bordure continue d'un noir intense.

Dans les viscères, on note de la dégénérescence vacuolaire des cellules hépatiques et de la tuméfaction trouble des épithéliums rénaux.

L'englobement des bactéridies s'observe surtout au point d'inoculation, pendant toute la durée de la maladie. On en voit des exemples dans les vaisseaux du foie et aussi dans le sang du cœur; ils sont plus rares dans les reins et dans les branchies.

Tels sont les faits principaux afférents au mode de réaction de l'hippocampe vis-à-vis du charbon.

Quant au parasite, nous avons indiqué les modifications morphologiques qui peuvent lui être imprimées; ces modifications sont éphémères; elles ne se reproduisent pas *in vitro*, où le microbe fait retour au type normal et, loin d'être atténué, a augmenté de virulence.

Nos bouillons charbonneux primitifs tuaient, 2 jours après l'ensemencement, un lapin du poids d'un kilogramme en 34 heures, à la dose d'un demi-centimètre cube injecté sous la peau.

Après passage dans l'organisme de l'hippocampe, la dose de la culture pure étant abaissée à un quart de c. c., un lapin du poids d'un kilogramme succombait en 26 heures; la semence provenait de l'hippocampe inoculé le 6 à la racine de la queue et mort spontanément le 15 septembre. A même dose, une culture

retirée d'un hippocampe chauffé tuait un lapin d'un kilogramme en 20 heures.

Un lapin pesant 1,150 grammes succombait en 30 heures à l'inoculation d'une culture prélevée sur gélose provenant de l'hippocampe inoculé le 6 à la racine de la queue, sacrifié le 7 septembre.

Des cultures, fournies par un hippocampe inoculé avec des spores charbonneuses, résultant les unes de l'ensemencement de la sérosité péritonéale, les autres du sang cardiaque, ont tué, les premières un lapin de 1,160 grammes en 24 heures et deux rats noirs de 75 et 80 grammes en 24 heures, les secondes deux rats noirs de 75 et 80 grammes en 20 heures et en 22 heures.

Ces expériences, toutes concordantes, montrent que la virulence de la bactéridie ne s'atténue pas, mais plutôt s'exagère après passage à travers l'organisme de l'hippocampe. A ce point de vue spécial, ce poisson marin se comporte donc comme un animal relativement réfractaire chez lequel l'infection expérimentale évolue lentement par suite d'une lutte énergique, qui relève essentiellement de la phagocytose entre l'organisme envahi et le parasite envahisseur.

La température de l'eau de mer, relativement basse, même pendant la saison estivale, contribue aussi, dans une certaine mesure, à ralentir la marche du processus infectieux et à retarder l'issue fatale. Mais ces moyens de défense deviennent impuissants et sont loin de suffire à immuniser l'animal.

Bientôt, l'agent microbien renforcé dans sa virulence se multiplie, envahit les organes, s'y développe en colonies compactes qui obstruent les vaisseaux. L'hippocampe ne tarde pas alors à succomber.

En élevant la dose des virus inoculés on provoque une intoxication suraiguë plutôt qu'une infection.

SOMMAIRE DES PRINCIPALES EXPÉRIENCES

— Deux hippocampes sont inoculés à la racine de la queue, le 6 septembre 1893, avec un quart de centimètre cube d'une culture datant de deux jours dans du bouillon peptonisé. L'un d'eux a été sacrifié le 7, l'autre le 8 septembre. La température de l'eau variait de 22° à 26° cent.

— A la même date, deux hippocampes sont inoculés avec la même culture et la même dose, l'un à la racine de la queue, l'autre dans la cavité générale; le 10, ils sont affaissés, occupent le fond des aquariums.

Ils meurent spontanément, le premier le 15 septembre, le deuxième le 12 septembre. A l'autopsie, on note un empâtement œdémateux aux points inoculés, une congestion marquée des reins et du foie. Le sang du cœur, aspiré dans des pipettes, est brunâtre et poisseux. La température diurne des aquariums oscillait, de janvier à septembre, entre 21° et 23°; elle subissait, pendant la nuit, des abaissements de 3° à 8° cent.

— Le 18 septembre, un hippocampe reçoit, à la racine de la queue, un demi-centimètre cube d'eau douce stérilisée dans laquelle on dilue une anse de culture sporulée sur gélose. L'animal meurt dans la nuit du 20 au 21 septembre. La température diurne variait de 21° à 18°.

— Un hippocampe est inoculé, le 20 septembre au matin, avec un demi-centimètre cube d'une culture datant de deux jours dans du bouillon de bœuf peptonisé. Placé, deux heures après, dans un large récipient d'eau de mer, bien aéré, contenu dans une étuve à 28°, l'animal est mort, complètement dépigmenté, le 21 au matin.

— Le 23 août 1894, deux hippocampes reçoivent dans la cavité générale un quart de centimètre cube d'un bouillon de culture récent; ils sont sacrifiés, l'un après l'autre, une heure et deux heures après l'injection. L'exsudat louche de la région inoculée — examiné en goutte pendante dans une solution aqueuse de bleu de méthylène, ou encore sur des lamelles desséchées à l'air libre, colorées au bleu, et montées avec précaution dans une goutte d'eau — montre un grand nombre de phénomènes de phagocytose.

TECHNIQUE

Les organes étaient étudiés :

1° Sur des frottis ;

2° Sur des coupes, après fixation par le sublimé, imprégnation au picro-carmin, inclusion dans la paraffine, coloration par les méthodes de Gram, Weigert ou simplement par le bleu de méthylène.

Nous ensemencions sur gélose et dans du bouillon, en observant avec d'autant plus de rigueur les précautions d'asepsie que la pratique nous avait appris la fréquence des infections accidentelles lorsqu'on opère sur les poissons.

Les cultures récentes étaient ensuite, après constatation de leur pureté, inoculées à des lapins et à des rats noirs (*mus rattus*) qui fournissaient à leur tour de nouvelles récoltes dont on vérifiait la pureté.

L'ÉTAT ACTUEL DE LA QUESTION DE L'IMMUNITÉ

(Rapport au Congrès International de Budapest.)

PAR EL. METCHNIKOFF.

Le lien organique qui réunit ces Congrès internationaux m'oblige à prendre la parole sur la question de l'immunité, qui a été un des principaux thèmes de la discussion au dernier Congrès de Londres.

A la fin du débat, M. Buchner, qui soutenait la théorie humorale de l'immunité, a exprimé l'espérance « que le prochain congrès nous trouvera en possession de faits qui permettront de jeter sur le problème débattu une lumière beaucoup plus vive. » (*Münch. med. Woch.* 1891, p. 671). La question a été étudiée depuis avec beaucoup de zèle et par un grand nombre de savants distingués. Sous ce rapport l'espérance de M. Buchner n'a pas été déçue. Résumons donc, aussi brièvement que possible, les principaux progrès réalisés pendant ces trois dernières années.

Commençons par la théorie humorale de l'immunité et par sa modification, justement soutenue par M. Buchner lui-même, et connue sous le nom de la *théorie du pouvoir bactéricide des humeurs*.

On se figurait d'après cette théorie que les microbes, entrés dans l'organisme, y subissaient une influence plus ou moins nuisible des humeurs naturelles, telles que le plasma sanguin, le liquide des exsudats, l'humeur aqueuse etc. Si ces humeurs détruisaient les microbes, l'organisme restait indemne et les cadavres des microbes tués étaient simplement balayés et emportés par les leucocytes. Si au contraire les humeurs étaient incapables de détruire les microbes, ceux-ci se développaient librement dans l'organisme, dépourvu de toute immunité.

Ni avant le Congrès de Londres, ni dans ces trois dernières années, on n'a jamais pu fournir un seul exemple concret de cette action humorale dans l'organisme animal. Mais un grand nombre de faits recueillis s'opposait à l'admission de la théorie bactéricide. Je ne citerai que l'exemple fourni par M. Stern de l'action bactéricide du sang humain vis-à-vis du bacille de la fièvre typhoïde. Assez marquée dans le sang des personnes normales, cette action diminue notablement chez les individus guéris. Elle est donc, dans ce cas, diamétralement opposée à l'immunité.

Probablement sous l'influence de tous ces faits, M. Buchner s'est cru obligé de modifier sa théorie. Dans ses dernières publications (*Münch. med. Woch.* 1894.) il formule la conception suivante. La propriété bactéricide du sang est due surtout aux leucocytes qui dégagent des *alexines*, capables de détruire les microbes. Lorsque, dans un processus infectieux, il s'établit une inflammation avec une accumulation considérable de leucocytes, ces cellules interviennent non pas seulement pour englober les microbes morts, mais bien pour dégager d'abord le fluide microbicide. Comme cette accumulation des cellules mobiles se fait grâce à leur sensibilité, on voit bien que la nouvelle conception de M. Buchner n'est plus une théorie purement humorale. L'immunité n'est pas due à une action bactéricide des liquides, action purement passive, mais bien à une intervention active des leucocytes qui arrivent sur le champ de bataille pour dégager leurs alexines. La théorie de M. Buchner est donc devenue une théorie cellulaire, faite pour concilier les anciennes théories de l'immunité.

Dans cet éclectisme, M. Buchner a été précédé par d'autres savants. Trois auteurs anglais, MM. Hankin, Kanthack et Hardy, ont déjà formulé une opinion qui devait réconcilier les théories opposées de l'immunité. Ils ont admis que les alexines bactéricides étaient un produit de sécrétion des leucocytes éosinophiles. Les granulations éosinophiles dégagées par les cellules, d'après cette conception, tuent les microbes qui sont ensuite englobés et dissous par les leucocytes non éosinophiles. Cette théorie est définivement réfutée par M. Mesnil, qui, dans un travail inédit exécuté dans mon laboratoire, a prouvé que chez certains poissons osseux et notamment chez la perche il n'existe pas du tout de granulations éosinophiles ni pseudo éosinophiles, et que malgré cela la destruction des microbes s'opère tout aussi bien par les phagocytes que chez les animaux doués de la plus grande quantité d'éléments éosinophiles.

Parmi les savants qui ont devancé M. Buchner dans la voie de la conciliation, je dois encore citer M. Denys et ses collaborateurs, qui ont tâché de démontrer le rôle des leucocytes dans la manifestation bactéricide du sang.

Voilà donc toute une série de tentatives qui démontrent l'impossibilité de persister dans la voie de la conception purement humorale de l'immunité.

Certains savants, qui voyaient bien que les microbes n'étaient pas détruits par les humeurs des animaux réfractaires, admettaient que les liquides de l'organisme suffisaient seulement à atténuer les bactéries. Ainsi naquit *la théorie de la propriété atténuante des humeurs* Lorsqu'un partisan de cette théorie, M. Sanarelli, vint dans mon

laboratoire pour faire des recherches sur l'immunité, je le priai de s'occuper de l'atténuation par les humeurs, en choisissant le vibrion de Gamaleïa (*V. Metchnikowi*), pour lequel certains faits semblaient indiquer l'existence de cette propriété. Les recherches de M. Sanarelli, publiées en 1893, ont démontré que cette atténuation n'existe pas en réalité, et que les phénomènes qui en avaient fait naître l'idée, s'expliquent par l'intervention d'un pouvoir préventif du sérum des animaux vaccinés. Toute une série de recherches de mon laboratoire ont prouvé le même fait pour le microbe de la pneumo-enterite des porcs, pour le pneumo-coque (Issaeff) et pour le vibrion cholérique.

A l'époque du Congrès de Londres, la découverte de M. Behring de la propriété antitoxique du sérum des animaux vaccinés contre le tétanos et la diphtérie était déjà connue, et acceptée unanimement comme une des plus grandes découvertes de ces derniers temps. Mais son application à la théorie de l'immunité était à peine commencée. Bientôt après le Congrès, parut le travail de MM. Klemperer qui tentèrent de donner une théorie de l'immunité de la pneumonie fibrineuse, basée sur la découverte des antitoxines. M. J. Klemperer devint un des plus ardents défenseurs de cette théorie du pouvoir antitoxique, qu'il appliqua aussi au choléra humain.

Je n'ai pas besoin d'insister longtemps sur l'impossibilité de soutenir cette théorie du rôle des antitoxines dans l'immunité. Comme l'avait déjà bien prévu M. Roux, dans son discours sur l'immunité au Congrès de Londres, la belle découverte de M. Behring ne pouvait nullement servir comme base d'une théorie générale de l'immunité. Des faits très nombreux, constatés depuis, ont pleinement confirmé cette opinion. Dans toute une série de maladies qui ont été étudiées sous ce rapport, l'étiologie n'a pu être nullement conciliée avec la théorie antitoxique. Il a d'abord été prouvé, pour l'immunité des lapins vis-à-vis du microbe de la pneumo-entérite des porcs, que ce phénomène ne tient pas du tout à une propriété antitoxique quelconque. Bientôt après M. Sanarelli fit la même constatation pour le vibrion de Gamaleïa, si voisin du vibrion cholérique. M. Issaeff a pu constater que même l'immunité acquise des lapins contre le pneumocoque, cette base fondamentale de la théorie des frères Klemperer, ne peut pas être attribuée à une influence antitoxique des humeurs.

Cette série de recherches, faites dans mon laboratoire, a été complétée par un travail important de MM. R. Pfeiffer et Wassermann, prouvant que l'immunité de l'homme contre le choléra et celle des cobayes contre la péritonite cholérique ne reposent nullement sur une propriété antitoxique du sang. Et ceci malgré le caractère éminemment toxique de ces maladies.

Mais même pour le tétanos et la diphtérie, ces deux infections qui ont servi de première base à la théorie antitoxique, celle-ci n'a pu suffire à expliquer l'immunité. Plus on a approfondi l'étude de ce phénomène, plus on a trouvé de faits inconciliables avec la théorie antitoxique. Je dois surtout mentionner ici une longue série de recherches de MM. Roux et Vaillard, qui ont constaté à maintes reprises que chez les animaux et l'homme, qui sont loin d'être réfractaires au tétanos, les humeurs peuvent acquérir un fort degré de propriété antitoxique.

L'auteur de la découverte de cette propriété, M. Behring lui-même, a été amené, à la suite de recherches minutieuses, à conclure que l'immunité dans le tétanos réside dans les propriétés cellulaires de l'organisme. M. Behring distingue la vraie immunité acquise ou « l'immunité active », d'après la terminologie de M. Ehrlich, de l'immunité passagère ou « passive ».

La première forme de l'immunité, la plus constante, est attribuée maintenant par M. Behring à une fonction cellulaire. Il n'y a que l'immunité passive, communiquée par l'injection des humeurs d'un animal vacciné à un animal neuf, que M. Behring considère comme purement humorale. D'après sa conception, il s'agit ici simplement d'un transport d'une partie de l'immunité acquise à un animal normal par l'intermédiaire du liquide sanguin.

Cette immunité passive, c'est-à dire la prévention des infections à l'aide des humeurs, a été confirmée pour un grand nombre de maladies. Il a d'abord été constaté que cette propriété préventive du sang peut exister souvent tout à fait en dehors d'un pouvoir antitoxique quelconque.

L'étude des phénomènes qui se passent dans ce processus de prévention a démontré qu'il s'agit ici d'une action stimulante des humeurs des animaux vaccinés sur l'organisme traité, et notamment sur ses éléments cellulaires. Il a été prouvé que, sous l'influence du sang vacciné il se produit une forte leucocytose, et en général une forte réaction cellulaire. Cette idée d'une action stimulante des humeurs vaccinées a été confirmée par plusieurs séries de recherches, dont quelques-unes proviennent de l'école de M. Koch. Ainsi MM. R. Pfeiffer et Wassermann la soutiennent pour la péritonite cholérique des cobayes. MM. C. Fränkel et Sobernheim l'appliquent à la même maladie. Dans cet ordre de travaux, je dois surtout mentionner celui de M. Issaeff (fait à l'Institut de M. Koch à Berlin) qui a constaté que, pour empêcher la péritonite cholérique des cobayes, il suffit de leur injecter préalablement des liquides qui stimulent les leucocytes. Parmi ces substances se trouve le bouillon nutritif ordinaire, liquide qui est un excellent milieu de culture pour le vibrion cholérique.

On voit bien, d'après tout ce qui vient d'être rapporté, que les partisans des théories humorales ont dû en général abandonner leur point de vue primitif et se rapprocher plus ou moins de la conception cellulaire de l'immunité.

A la fin d'une revue très circonstanciée, pleine de modération et d'impartialité, M. Stern résume de la façon suivante l'état actuel de la question : « La conception humorale exclusive de l'immunité, — au moins dans la grande majorité des cas — est insuffisante. C'est précisément l'étude exacte de l'action du sang et des humeurs, privés de cellules, qui nous porte à admettre que l'immunité repose le plus souvent sur un changement des cellules mêmes ou de leurs fonctions. » (*Centr. f. allg. Pathol.* 1894, p. 263.)

Voici donc le principal progrès accompli depuis le Congrès de Londres dans l'étude de l'immunité. Sur le terrain cellulaire, le seul qui reste, la divergence des opinions est déjà plus facile à apaiser. *L'immunité se réduit à la sensibilité et à l'activité des éléments cellulaires de l'organisme.* Mais il faut se demander quelles catégories de cellules jouent ici le premier rôle et quelles sont les manifestations cellulaires dans l'immunité ?

Nous avons vu que même M. Buchner accepte maintenant un rôle important des leucocytes dans l'immunité. Un autre représentant de l'école de Munich, plus intransigeant encore, M. Emmerich, parle dans sa dernière publication (*Münch. med. Woch.* 1894, p. 622) des leucocytes, comme centres de la substance albuminoïde active qui provoque la guérison. Seulement, dans ces conceptions, l'englobement et la destruction intra-cellulaire des microbes ne jouent aucun rôle. C'est la théorie des phagocytes qui attribue une grande importance à ces fonctions cellulaires. Eh bien, peut-on considérer cette théorie comme répondant à l'ensemble des faits si nombreux, accumulés pendant ces trois dernières années ?

Fondée il y a onze ans, c'est-à-dire bien avant les théories humorales que nous avons analysées, la théorie des phagocytes a rencontré un grand nombre d'objections et a résisté à toute une série de tempêtes, provoquées par la découverte des vaccinations chimiques, de la propriété bactéricide et du pouvoir antitoxique des humeurs. Tous ces faits et un grand nombre d'autres, paraissaient d'abord fournir des difficultés insurmontables, et cependant la théorie des phagocytes, examinée de plus près, a pu être facilement conciliée avec eux.

Tandis que l'étude de la propriété bactéricide des humeurs se faisait surtout en dehors de l'organisme, la fonction phagocytaire des cellules était de préférence étudiée dans l'organisme même. De cette façon il a été établi que l'englobement des microbes par les phagocytes se fait

avec une rapidité qu'on ne pouvait jamais prévoir. M. Werigo a constaté qu'un assez grand nombre de bactéridies injectées dans le sang des lapins, est englobé par les cellules immédiatement après l'injection, et que la majorité de ces microbes se trouve dans les phagocytes au bout de peu de minutes. M. Borrel a confirmé ce fait pour le bacille de la tuberculose, dont un grand nombre est englobé par les leucocytes quelques minutes après l'inoculation intravasculaire. Ces données démontrent que les microbes, entrés dans l'organisme, sont, avec une vitesse extraordinaire, saisis par les cellules et soustraits à l'action directe des humeurs, ce qui corrobore l'opinion du rôle éminent des phagocytes.

Cette dernière conclusion est encore confirmée par la généralité des phénomènes phagocytaires dans l'immunité. Autrefois on pouvait supposer que la réaction phagocytaire était une règle soumise à des exceptions plus ou moins nombreuses, ce qui ne paraissait du tout étonnant, vu la complexité des phénomènes biologiques. Mais plus on a étudié cette question, plus on a dû se convaincre de la généralité de la phagocytose. Même dans les maladies les plus toxiques, comme le tétanos et la diphtérie, la réaction phagocytaire joue un très grand rôle. Ce fait a été rigoureusement établi par M. Vaillard et ses collaborateurs pour le tétanos. Pour ce qui concerne la diphtérie, M. Lubarsch [1] insistait sur la contradiction de la phagocytose avec l'immunité. Mais un travail que M. Gabritchewsky vient de faire dans mon laboratoire [2], prouve que l'immunité des lapins contre la diphtérie se trouve en parfait accord avec la théorie des phagocytes. Une autre exception, sur laquelle insiste M. Lubarsch, n'existe non plus en réalité. M. Lubarsch affirme que le bacille de la septicémie des souris, si abondant dans les leucocytes de ces animaux, des plus sensibles, n'est presque jamais englobé par les phagocytes de la grenouille, animal réfractaire. Or, M. Mesnil, dans un travail qui va paraître prochainement, a démontré, d'une façon très exacte, la grande extension de la phagocytose dans ce même exemple.

Dans un travail du laboratoire de M. Straus, deux de ses élèves ont affirmé que le développement du tubercule expérimental se fait en dépit des postulats de la théorie des phagocytes.

M. Borrel, dans deux mémoires sur le tubercule des poumons et des reins, a répondu à cette objection, et a complètement démontré l'application de la théorie des phagocytes à la tuberculose expérimentale.

On pouvait plus facilement supposer l'absence de la réaction pha-

1. *Ueb. Immunitat. Schutzimpfung*, 1892, p. 18.
2. Voir dans le numéro des *Annales*, p. 673.

gocytaire, dans les cas où des microbes, pathogènes pour les animaux supérieurs, entrent en rapport avec l'organisme des invertébrés. Quoi de plus simple, en effet, que d'accepter que les humeurs des mollusques ou des arthropodes soient complètement incapables de conserver à l'état vivant, la bactéridie charbonneuse, ce parasite exclusif des vertébrés à sang chaud. Ne connait-on pas des mollusques capables de sécréter de l'acide sulfurique très fort? Eh bien, M. Karlinsky a constaté que la bactéridie, injectée dans le corps des escargots, y disparaissait au bout d'un temps très court, et que l'ensemencement du point d'inoculation et du sang, ne donnait aucune culture. Ce fait avait été cité comme objection contre la théorie des phagocytes. M. Lubarsch en joignit un autre, concernant les crustacés. Chez ces animaux, l'injection des bactéridies dans la circulation, est suivie de leur disparition complète au bout d'une période extrêmement courte. M. Kowalevsky [1], le célèbre zoologiste, a répondu récemment à ces objections. Les faits, signalés par MM. Karlinsky et Lubarsch sont exacts, mais leur interprétation ne l'est pas. En réalité, la disparition des bactéridies de la circulation n'est nullement due à la destruction de ces microbes, mais uniquement à leur englobement par des phagocytes, accumulés dans certains organes qu'on peut comparer aux ganglions lymphatiques et à la rate des vertébrés. Chez les escargots, les bactéridies englobées se conservent à l'état vivant et virulent pendant 48 heures, et chez les écrevisses même pendant 4 jours.

J'ai tenu à rapporter ces résultats dans mon aperçu, car les phénomènes phagocytaires chez les animaux inférieurs constituent la base fondamentale de toute la théorie. Des recherches nombreuses de plusieurs zoologistes distingués l'ont définitivement consolidée.

L'extension générale de la phagocytose a donc été établie par des recherches sur des animaux très différents et vis-à-vis des microbes des plus variés. Les bactéries, découvertes dans ces derniers temps, ont été également signalées comme se conformant à la règle. Le coccobacille de la peste orientale, qui vient d'être découvert, se trouve, dans les cas les moins graves, en grande quantité dans l'intérieur des phagocytes, comme en témoigne M. E. Roux. Le petit bacille de l'influenza, découvert par M. R. Pfeiffer, présente des rapports constants et très intéressants avec les leucocytes. Au début de la maladie la plupart de ces microbes sont libres, mais au fur et à mesure de la convalescence, leur englobement par les leucocytes devient de plus en plus considérable. Malheureusement M. Pfeiffer, qui depuis longtemps est un partisan très zélé des théories humorales, n'a pas fait d'expériences directes sur l'état dans lequel se trouvent les bacilles englobés.

1. *Mélanges biologiques de l'Acad. de Saint-Pétersbourg*, 1894, t. XIII, p. 437.

Ce n'est que par analogie avec d'autres cas et en raison de la colorabilité normale de ces microbes, qu'on peut supposer qu'ils ont été englobés par les phagocytes à l'état vivant.

Pendant ces deux dernières années, où l'attention des bactériologistes a été attirée surtout vers le choléra, on s'est beaucoup occupé des phénomènes phagocytaires dans la péritonite des animaux, provoquée par le vibrion de Koch. Dans le premier travail, où cette maladie a été bien établie, M. R. Pfeiffer s'est posé sur le terrain exclusif de la théorie bactéricide des humeurs. Il pensait que les vibrions, pour manifester leur action toxique, étaient préalablement détruits par la force bactéricide du liquide de l'exsudat. Il niait alors complètement le rôle actif des phagocytes qu'il n'avait jamais vu non plus fonctionner dans le cas du vibrion de Gamaleïa, si analogue au choléra, (surtout pour ce qui concerne la péritonite expérimentale des cobayes). Dans son second travail, publié en collaboration avec M. Wassermann, M. Pfeiffer s'assura de l'intervention des phagocytes dans l'élimination des vibrions chez les cobayes réfractaires, mais il pensa que ces microbes n'étaient englobés qu'après avoir été détruits par un facteur extracellulaire, encore non déterminé. Dans le but d'élucider cette question, M. Issaeff [1] entreprit dans le laboratoire et sous la direction de M. Pfeiffer une étude très circonstanciée. Il a pu se convaincre de la grande extension et de l'importance capitale de la réaction phagocytaire dans la péritonite cholérique des cobayes. Cette résistance remarquable qui est provoquée par une simple injection du bouillon, de la tuberculine ou de toute une série d'autres substances, s'explique, d'après M. Issaeff, par la stimulation des phagocytes qui s'incorporent les vibrions et débarrassent ainsi l'organisme de ces producteurs de poisons. M. R. Pfeiffer [2] a accepté cette interprétation. Il attribue donc maintenant un rôle considérable aux phagocytes, mais il distingue entre la résistance passagère, due à l'injection du bouillon et d'autres substances, et la vraie immunité, provoquée par la vaccination avec le vibrion ou ses produits toxiques. Dans la première, ce sont les leucocytes qui préservent l'organisme, tandis que, dans la vraie immunité, la destruction des vibrions est due à d'autres facteurs. Dans son dernier travail sur ce sujet, qui vient de paraître [3], M. Pfeiffer insiste sur l'action bactéricide du liquide de l'exsudat péritonéal des cobayes *hypervaccinés* contre le vibrion cholérique. Voici les faits qu'il a constatés. Lorsqu'on injecte, dans le péritoine de ces cobayes hypervaccinés, des vibrions cholériques vivants, on trouve dans le liquide péritonéal, extrait peu de temps

1. *Zeitsch. für Hyg.*, t. XVI, 1894, p. 287.
2. *Ibid.*, 268.
3. *Ibid.*, t. XVIII, p. 1.

(10 à 20 minutes) après, très peu de leucocytes et une quantité de vibrions, devenus immobiles et transformés en petits globules sphériques. Au fur et à mesure que le nombre de ces globules diminue, celui des leucocytes augmente. Les mêmes phénomènes ont été constatés par M. Pfeiffer, lorsqu'il injectait dans le péritoine des cobayes neufs une certaine quantité de culture cholérique, mélangée avec du bouillon et du sérum sanguin de cobayes hypervaccinés.

Se basant sur ces faits, établis très exactement et à maintes reprises, M. R. Pfeiffer se fait la conception suivante du mécanisme intime de l'immunité. A la suite de l'injection des vibrions cholériques dans le péritoine des cobayes hypervaccinés, les cellules vivantes, probablement les éléments de l'endothélium, sécrètent un liquide qui tue les vibrions et les dissout au bout de peu de temps. Les leucocytes n'interviennent que tardivement et ne jouent qu'un rôle purement secondaire. M. Pfeiffer arrive à cette conclusion que « pour la péritonite cholérique des cobayes, la théorie des phagocytes doit être considérée comme définitivement erronée » (p. 4).

Avant d'entrer dans la critique des déductions de M. Pfeiffer, je dois remarquer que sa conception de l'immunité rentre dans le cadre des théories cellulaires, analogues à celles que j'ai analysées plus haut. La destruction des vibrions n'est plus due au plasma sanguin, tel quel, (comme l'admettait autrefois M. Pfeiffer), mais bien à un liquide, sécrété par des cellules, irritées par l'invasion des microbes. M. Pfeiffer semble ne pas se douter que sa conception actuelle de l'immunité est tout-à-fait pareille à celle que M. Emmerich avait formulée en 1887 pour l'immunité des lapins vis-à-vis du bacille du rouget des porcs. Je n'ai pas besoin de reproduire ici la discussion au sujet de cette théorie qui a dû être abandonnée. Voyons jusqu'à quel point elle peut être soutenue pour le cas spécial de la péritonite cholérique des cobayes.

Dans mes études, j'ai pu me servir non seulement des animaux que j'avais vaccinés, mais encore du sérum des cobayes hypervaccinés que m'avait obligeamment offerts M. Pfeiffer lui-même. Je lui exprime ici toute ma gratitude pour son offre aimable et loyale.

Comme il était facile de prévoir, les faits, constatés par un observateur si consciencieux et si habile, se sont montrés parfaitement exacts. Les vibrions, injectés dans le péritoine des cobayes hypervaccinés, ont été trouvés dans le liquide, retiré au bout de quelques minutes, en grande partie transformés en globules immobiles et ronds. Le nombre de ces globules diminuait avec chaque prise nouvelle de l'exsudat, dans lequel les leucocytes devenaient au contraire chaque fois plus nombreux. Mais ce liquide péritonéal, conservé en goutte

suspendue à l'étuve, donnait toujours des cultures abondantes de vibrions. L'observation directe a démontré d'une façon irréfutable qu'au moins la grande majorité de ces globules se transforment dans ces conditions en vibrions immobiles, souvent en des formes de spirilles. Par contre je n'ai jamais observé de dissolution des globules dans le liquide péritonéal. En parfaite harmonie avec ces constatations s'est trouvé le fait que les microbes cholériques se conservent dans le péritoine des cobayes hypervaccinés à l'état vivant pendant des heures.

Les vibrions cholériques d'Inovraclaw que m'avait obligeamment envoyés M. Pfeiffer, et dont une anse de platine de culture sur gélose (également préparée par M. Pfeiffer), mélangée avec 1 c. c. de bouillon et 0,2 c. c. de sérum des cobayes hypervaccinés par M. Pfeiffer, est injectée dans le péritoine d'un cobaye neuf, se retrouvent, au bout de très peu de temps, dans le liquide retiré, sous forme de globules immobiles. Mais cela n'empêche pas que l'exsudat péritonéal des mêmes cobayes ne fournisse des cultures pures du vibrion cholérique, même lorsque le liquide, rempli de leucocytes, avait été retiré sept heures après le début de l'expérience.

En suivant rigoureusement les règles prescrites par M. Pfeffer, j'ai donc pu m'assurer que les vibrions cholériques, dans le péritoine des cobayes hypervaccinés ou dans celui des cobayes neufs qui ont reçu le sérum hypervacciné, restent vivants pendant plusieurs heures. Le liquide péritonéal, dans lequel on ne trouve que de rares vibrions englobés par les leucocytes, donne encore des cultures abondantes. Le plasma de l'exsudat était donc incapable de tuer les microbes.

Cette transformation des vibrions en globules immobiles doit pourtant être analysée. D'après M. Pfeiffer, les leucocytes n'y sont pour rien, parce qu'ils sont encore trop rares dans « l'exsudat péritonéal ». L'action doit être plutôt attribuée, pense M. Pfeiffer, a une sécrétion des cellules endothéliales. Dans ces réflexions, mon savant contradicteur ne tient pas du tout compte de ce fait que le péritoine des cobayes renferme de la lymphe, très riche en leucocytes. Il est vrai que lorsqu'on n'en retire qu'une toute petite goutte, elle peut se présenter très pauvre en globules blancs; mais il suffit d'en retirer davantage, pour s'assurer de sa richesse en ces éléments. Lorsque le processus de la réaction contre l'injection péritonéale des vibrions est plus avancée, il arrive aussi qu'une goutte du liquide retiré se présente pauvre en leucocytes. Mais, en sacrifiant l'animal, on trouve des pseudo membranes qui recouvrent le foie et le mésentère, et qui sont composées d'une quantité énorme de ces phagocytes.

L'observation directe nous prouve aussi que les leucocytes de la lymphe péritonéale ne doivent nullement être exclus comme facteur

dans la transformation des vibrions en globules. Lorsqu'on retire le liquide péritonéal, déjà cinq minutes après l'injection des vibrions. mélangés avec le sérum préparé par M. Pfeiffer, on est frappé par le phénomène suivant: les leucocytes se montrent entourés d'une couche de vibrions, en grande partie déjà transformés en globules. Tandis que les leucocytes polynucléaires, mononucléaires et même les éosinophiles, sont enveloppés d'une masse épaisse de ces microbes, les lymphocytes et les globules rouges restent complètement nus, et ne sont entourés d'aucun microbe. Ce fait, que j'ai constaté à plusieurs reprises, démontre l'existence d'une action chimiotactique des leucocytes dénommés vis-à-vis des vibrions cholériques Ces cellules attirent donc les microbes. Pour arriver jusqu'à elles, les vibrions ont dû nager dans le plasma de la lymphe; ce n'est qu'au voisinage intime des leucocytes qu'ils ont perdu leur mobilité. L'action de ces cellules sur les vibrions est donc incontestable. En observant le phénomène pendant un temps plus long, on constate une zone transparente entre la couche des vibrions et la surface des leucocytes. Il y a donc quelque production du liquide autour des globules blancs. Est-ce une sécrétion véritable? Il est difficile de l'affirmer, parce que tous les leucocytes qu'on trouve dans ces conditions, sont complètement immobiles et paraissent par conséquent morts. La question de savoir si cette mort des leucocytes s'opère déjà dans l'animal, où bien ne survient qu'au moment de l'extraction du liquide péritonéal, demande des recherches spéciales.

Il extrêmement probable que le pouvoir bactéricide du sérum sanguin des cobayes vaccinés, constaté par MM. Behring et Nissen pour le vibrion de Gamaleïa, et par M. Zâslein pour le vibrion de Koch, est la manifestation de la même propriété. Or, il devient de plus en plus admissible que dans ces cas la propriété bactéricide est en dernière instance liée aux leucocytes. Les recherches, exécutées par M. J. Bordet dans mon laboratoire, aboutissent precisément à cette conclusion.

Voici donc comment on peut interpréter les phénomènes observés par M. R. Pfeiffer: les phagocytes des cobayes vaccinés élaborent dans leur intérieur des substances capables de tuer les vibrions. A l'état de hypervaccination, ces substances deviennent tellement abondantes qu'elles peuvent facilement s'échapper au dehors. Il se produit ici quelque chose d'analogue avec ce que l'on observe dans la digestion. Chez les animaux inférieurs la digestion est entièrement intracellulaire; mais avec la marche progressive de l'évolution, elle devient d'abord mixte, intracellulaire et en partie extracellulaire. Théoriquement parlant, on pourrait peut-être amener tous les phagocytes, et peut-être même les autres cellules, à sécréter leurs substances

bactéricides et transformer ainsi la destruction intra cellulaire des microbes en une destruction extracellulaire. Seulement, en réalité, on est encore loin de cet idéal. Et même dans le cas spécial étudié par M. Pfeiffer, comme nous avons vu, il ne s'agit que d'une action bactéricide médiocre du liquide leucocytaire. Je dois insister surtout sur ce fait que j'ai constaté un très grand nombre de fois, et aussi chez des cobayes hypervaccinés contre le vibrion cholérique, que le liquide ne renfermant que des microbes englobés dans des phagocytes, donne des cultures pures. Introduit à l'étuve sous forme de goutte suspendue, ce liquide présente le phénomène que j'ai déjà décrit plusieurs fois et qui a encore tout récemment été confirmé par M. Cantacuzène [1]. Les leucocytes, morts dans ces conditions, se gonflent et se transforment en des sacs remplis de vibrions qui finissent par envahir toute la goutte. Cette expérience montre que les microbes ont été englobés à l'état vivant, et que toutes les forces bactéricides extracellulaires étaient impuissantes à tuer toutes les bactéries. J'insiste sur ce fait, comme objection principale à la nouvelle interprétation de M. R. Pfeiffer, ainsi qu'à toutes les autres théories humorales ou humoro-cellulaires, et entre autres à la nouvelle théorie de M. Buchner, mentionnée au début de cette Revue. Dans un travail particulier je tâcherai de répondre en détail aux conclusions de M. Pfeiffer. Ici je me bornerai à lui dire que même ses propres recherches et celles auquelles il a assisté (Issaeff), ne justifient nullement son opinion sur la non application de la théorie des phagocytes à la péritonite cholérique des cobayes. Même en partageant complètement sa manière de voir, on doit reconnaître qu'elle ne s'applique que pour quelques cas spéciaux de cette affection. Pour observer les phénomènes de dégénérescence extracellulaire des vibrions M. Pfeiffer a dû recourir à des cobayes hypervaccinés (*hochimmunisirte*), car les animaux résistants à la suite de la vaccination ordinaire ne montrent que le processus habituel de la réaction phagocytaire. Comme exemple de l'immunité naturelle, due à une influence des liquides, M. Pfeiffer cite des cobayes, dans la cavité péritonéale desquels il injectait une culture de vibrions, cultivés pendant 7 ans sur des milieux artificiels, et devenue absolument inoffensive pour les animaux. Dans ce cas « les vibrions disparaissent en 20 à 30 minutes, sans un concours considérable de phagocytes ». Précisément, cette circonstance, que M. Pfeiffer a dû s'adresser à une variété cholérique aussi modifiée pour démontrer le rôle bactéricide du plasma, démontre clairement qu'avec d'autres cultures les choses se passent tout autrement. Eh bien, on a pour ainsi dire chaque

1. *Recherches sur le mode de destruction du vibrion cholérique dans l'organisme*. Paris 1894.

jour occasion d'observer l'immunité naturelle des cobayes vis-à-vis des vibrions cholériques, même des plus virulents (en se servant de faibles doses ou bien en injectant sous la peau) et on constate facilement que ce ne sont pas les phénomènes phagocytaires qui manquent dans ces conditions.

Comme la majorité des cas d'immunité naturelle et d'immunité acquise (vaccination simple) vis-à-vis du vibrion cholérique, reposent sur une réaction purement phagocytaire, on n'a pas le droit d'affirmer, comme le fait M. Pfeiffer, que la péritonite cholérique des cobayes soit en désaccord avec la théorie des phagocytes. Cet argument des vibrions, affaiblis pendant sept années de culture, pour prouver la non intervention des phagocytes, correspondrait à dire que les vibrions cholériques ne poussent pas sur la gélatine alcaline, parce qu'il y a des vibrions dégénérés qui ne se développent pas sur ce milieu.

La théorie des phagocytes, malgré l'affirmation de M. Pfeiffer, s'applique très bien à la péritonite cholérique des cobayes, comme elle s'applique à un très grand nombre de phénomènes de résistance de l'organisme contre l'invasion des microbes en général. On a même essayé de pénétrer plus profondément dans le mécanisme de l'action des phagocytes. Je dois mentionner ici la tentative de M. A. Kossel, d'expliquer la fonction bactéricide de l'acide nucléique, qui n'agit que dans un milieu acide, par la supposition que cette substance tue les microbes dans l'intérieur des cellules. Or, on sait que dans ces conditions l'acidité se conserve dans les vacuoles intracellulaires, tandis que dans les liquides de l'organisme animal l'acide est immédiatement neutralisé.

Bien que l'hypothèse si ingénieuse de M. Kossel soit très probable *a priori*, il faut admettre que la destruction intracellulaire des microbes peut se faire aussi dans un milieu alcalin. Comme exemple, je puis citer le cas de la dégénérescence des bacilles tuberculeux dans les cellules géantes de la gerbille, où la sécrétion de phosphate de chaux et les réactifs divers démontrent la réaction fortement alcaline du contenu cellulaire.

Des recherches nombreuses, faites dans ces dernières années, résulte non seulement la grande généralité de la phagocytose, comme moyen de destruction des microbes, mais encore l'extension du rôle des phagocytes en dehors de l'englobement des corps solides. La grande sensibilité de ces cellules vis-à-vis des produits solubles des microbes, faisait supposer une action des phagocytes sur les toxines. M. Chatenay [1] a fait dans mon laboratoire une étude sur la

1. *Les réactions leucocytaires vis-à-vis de certaines toxines végétales et animales.* Paris, 1894.

réaction leucocytaire des animaux empoisonnés par des toxines bactériennes (diphtérine et tétanine), phanérogamiques (ricine et abrine) et animales (venin des serpents). Il a pu constater une grande analogie avec les phénomènes connus dans les infections bactériennes. Lorsque la mort survient au bout de très peu de temps, le nombre des leucocytes diminue ; s'il y a une survie au delà de vingt-quatre heures ou une résistance définitive, il se produit une hyperleucocytose plus ou moins prononcée.

J'ai étudié la leucocytose des lapins, empoisonnés par l'acide arsénieux, et j'ai pu également constater une hypoleucocytose prononcée dans des cas mortels. Mais chez les animaux accoutumés à l'arsenic, les mêmes doses qui amenaient l'hypoleucocytose et la mort des lapins témoins, produisaient une augmentation considérable du nombre des leucocytes. Ces expériences, prouvant d'un côté la réaction leucocytaire contre les poisons, démontrent de l'autre côté que l'hyperleucocytose peut être provoquée non seulement par les protéines, mais aussi par des substances sûrement toxiques.

Dans cet ordre d'idées, je dois signaler les faits très intéressants réunis par l'école de M. Kobert à Dorpat. Après avoir introduit dans l'organisme de différents animaux une préparation de fer très soluble (saccharate de fer oxydé du docteur Horneman ; *ferrum oxydatum saccharratum solubile*), ne précipitant pas dans les milieux alcalins, M. Kobert et ses élèves, Stender, Samoïloff, Lipsky et autres [1], ont suivi la circulation du métal dans les tissus. Ils ont constaté qu'une faible quantité de fer est éliminée par les reins et la paroi intestinale, mais que la plus grande partie du métal est arrêtée dans les organes, surtout dans le foie, la rate et la moelle des os. Le fer y est absorbé par les leucocytes qui le fixent pour longtemps et le déversent dans l'intestin, dans lequel ils se dirigent, poussés par une force encore inconnue (*l. c.*, IX, p. 82).

J'ai eu l'occasion d'observer cette circulation du sel soluble du docteur Hornemann dans l'organisme de plusieurs espèces de vertébrés. Quelques temps après son introduction dans l'organisme par voie sanguine, péritonéale ou sous-cutanée, on trouve le fer (à l'aide de la réaction microchimique avec le ferrocyanure de potassium) accumulé dans les diverses catégories des phagocytes, notamment dans les leucocytes, les cellules endothéliales du foie et les cellules de la pulpe splénique. Les cellules qui ne remplissent pas de fonctions phagocytaires, comme par exemple les leucocytes basophiles d'Erlich, si abondants dans la lymphe des rats, ne se chargent que fort peu de

1. *Arbeiten d. pharmacologischen Instituts zu Dorpat.* VII - X, 1893, 1894.

fer, tandis que les leucocytes polynucléaires et les grands mononucléaires en sont remplis.

MM. Charrin et Carnot[1] ont constaté tout récemment que le plomb se dépose de préférence dans les organes lésés, mais ils n'admettent pas dans ce cas le transport par les leucocytes, car le pus ne donne pas la réaction de plomb. Il est probable que cette contradiction n'est qu'apparente : les cellules mortes du pus sont incapables d'absorber le métal, mais ce sont vraisemblablement d'autres phagocytes, peut-être des cellules endothéliales des parties lésées, qui accomplissent la résorption. Dans tous les cas, les résultats des recherches sur la circulation de fer, qui ont été étendus par M. Samoiloff[2], de l'école de Dorpat, aux sels solubles d'argent, démontrent le grand rôle que jouent les éléments phagocytaires dans l'absorption et le transport des métaux. Cela suffit pour attribuer à ces cellules une grande importance, comme centres thérapeutiques de l'organisme. Les phénomènes leucocytaires dans les empoisonnements par les toxines organiques, dans l'accoutumance de l'organisme vis-à-vis de l'arsenic, corroborent cette conclusion. D'un autre côté, ce résultat que, dans la prévention et la thérapeutique des infections à l'aide des sérums, il s'agit d'une stimulation de la résistance cellulaire, montre une fois de plus la vaste étendue qu'occupent, dans les phénomènes de guérison et d'immunité, les fonctions relatives des cellules en général et des phagocytes en particulier.

Arrivés à la fin de notre aperçu, nous devons constater la victoire de la théorie cellulaire de l'immunité et l'échec des théories purement humorales, et insister sur ce résultat général que l'immunité dans les maladies infectieuses est due à l'activité des cellules vivantes de l'organisme. Parmi ces éléments, le premier rôle doit être sûrement attribué aux phagocytes.

Résumé du rapport sur l'immunité.

1. Les représentants des théories humorales de l'immunité ont modifié leur conception. En attribuant la propriété bactéricide à des produits des leucocytes et en admettant que ces cellules se dirigent, à la suite de leur sensibilité, vers les points envahis par les microbes ; M. Buchner se rapproche de l'interprétation cellulaire de l'immunité ;

2. En supposant que l'immunité est due à des liquides sécrétés par les cellules endothéliales, excitées par les microbes, M. R. Pfeiffer rétablit la théorie abandonnée de M. Emmerich, et modifie son ancienne conception purement humorale dans le sens de la théorie cellulaire ;

1. *Semaine médicale* 1894, p. 385.
2. *Arb. d. pharm. Inst. Dorpat.* IX, 1893, p. 27.



3. En admettant qu'en dehors de l'immunité passive, attribuable aux humeurs, il existe une immunité active, durable, due à une fonction cellulaire, M. Behring se range aussi du côté des partisans des théories cellulaires;

4. Mais l'immunité passive, provoquée par le sérum vacciné ou par d'autres substances préventives (bouillon, tuberculine, etc.), se réduit aussi à une stimulation de la réaction cellulaire. Il devient de plus en plus probable que même l'action antitoxique des humeurs repose non sur la destruction des toxines, mais aussi sur l'excitation de la défense cellulaire;

5. La théorie, d'après laquelle les bactéries seraient détruites par des sécrétions des leucocytes éosinophiles, est réfutée par des faits précis;

6. La théorie des phagocytes se trouve en harmonie avec tous les faits établis depuis sa fondation;

7. Les exemples qui ont été invoqués comme exceptions de la fonction phagocytaire : septicémie des souris, diphtérie, charbon chez les crustacés et les mollusques, après un examen approfondi, rentrent bien dans les cadres de la théorie des phagocytes;

8. La péritonite cholérique des cobayes rentre aussi dans la catégorie des maladies infectieuses, dans lesquelles la fonction antibactérienne des phagocytes est des plus évidentes. Les phénomènes de dégénérescence des vibrions dans le liquide péritonéal chez des cobayes hypervaccinés, phénomènes décrits par M. R. Pfeiffer, s'expliquent par une action des produits des leucocytes, modifiés sous l'influence de l'hypervaccination;

9. La destruction des microbes dans l'intérieur des phagocytes peut se faire dans un milieu acide, conformément à l'opinion de M. A. Kossel sur l'action de ses acides nucléiques. Mais cette destruction peut se faire aussi dans un milieu alcalin, dans le contenu des phagocytes;

10. Les phagocytes réagissent non seulement contre l'invasion des microbes, mais aussi dans les intoxications de l'organisme par divers poisons. Leur rôle a été mis en évidence (surtout par l'école de M. Kobert) même pour des substances inorganiques, telles que le fer et l'argent;

11. D'après tout l'ensemble des progrès accomplis dans ces dernières années, il faut considérer l'immunité comme le résultat d'une activité cellulaire;

12. Parmi les éléments qui fonctionnent dans l'immunité, le premier rôle doit être attribué aux phagocytes.

SUR LES SÉRUMS ANTITOXIQUES

Communication faite au Congrès de Budapest

PAR M. E. ROUX

Il n'est pas actuellement de question plus intéressante pour le biologiste et le médecin que celle des sérums préventifs et thérapeutiques. Elle est née avec les expériences de Maurice Raynaud sur le sang des génisses inoculées du Cow-pox, et avec celles de MM. Richet et Héricourt sur le sérum des chiens et des lapins vaccinés contre une septicémie spéciale. Mais son importance n'a été comprise qu'après les travaux de MM. Behring et Kitasato sur le tétanos et la diphtérie. La sérum-thérapie vient de nous donner un traitement efficace de cette dernière maladie; elle a donc un intérêt pratique aussi grand que scientifique.

Depuis la découverte de M. Behring, on a constaté que le sérum des animaux immunisés contre diverses maladies contagieuses est préventif et thérapeutique. Il en est ainsi pour le sérum des animaux vaccinés contre la pneumonie, le choléra, etc.; c'est donc là une propriété assez générale. Ces qualités des sérums ont été expliquées par l'action neutralisante qu'ils exercent sur les poisons microbiens. Qui ne connaît la belle expérience qui consiste à faire voir que la toxine tétanique et la toxine diphtérique cessent d'être nocives quand elles sont mélangées avec un peu de sérum d'un animal vacciné contre le tétanos ou la diphtérie? Mais ce pouvoir antitoxique, si marqué dans les sérums antitétanique et antidiphtérique, ne se retrouve plus dans le sang des animaux vaccinés contre les autres maladies que nous avons énumérées. Le sérum des lapins rendus réfractaires au hog-choléra ou à l'infection pneumonique, pas plus que celui des cobayes vaccinés contre le choléra ou le vibrion avicide, ne manifeste aucun pouvoir antitoxique, ni *in vitro*, ni dans l'organisme. Ce fait est bien acquis depuis les recherches de M. Metchnikoff sur le hog-choléra, de M. Issaef sur la pneumonie, de M. Pfeiffer sur le choléra, de M. Sanarelli sur le vibrion avicide et la fièvre typhoïde. Les animaux immunisés sont tout aussi sensibles au poison de ces maladies que les animaux neufs. Leur sérum ne protège pas contre la toxine, mais contre le microbe. M. Metchnikoff en a trouvé la raison dans ce fait que ces

sérums sont des stimulants des cellules phagocytaires, qui englobent alors les microbes introduits et les détruisent par une véritable digestion. La maladie est réduite à une lutte locale.

Puisque ces sérums préventifs agissent comme des stimulants cellulaires, on comprend que le sérum d'un animal vacciné contre une maladie puisse être efficace contre une autre. Dans ces derniers temps, M. Duntschman a constaté que le sérum des animaux immunisés contre le charbon symptomatique agit sur le bacille de la septicémie aiguë. D'ailleurs, le sérum de l'homme sain, et parfois aussi celui du cheval, comme l'a montré M. Pfeiffer, ont des propriétés immunisantes très marquées contre l'infection cholérique intra-péritonéale. Il semble donc que ce pouvoir préventif du sérum contre les virus vivants ne soit pas toujours spécifique, puisqu'il se rencontre chez des animaux qui n'ont jamais éprouvé l'action du microbe contre lequel leur sang protège. Il n'y a rien là de bien surprenant, puisque, suivant l'expression de M. Metchnikoff, il s'agit non pas d'« antitoxines » mais de « stimulines », dont plusieurs seraient capab le d'un même effet.

Mais préserver contre un microbe vivant, qui doit se développer avant d'agir, est tout autre chose que de préserver contre une toxine. Jusqu'ici nous ne connaissons que le sérum des animaux immunisés contre le tétanos, la diphtérie, l'abrine, la ricine et le venin des serpents qui soient antitoxiques. Ce pouvoir antitoxique s'affirme alors avec une telle puissance que, pour le tétanos par exemple, il dépasse l'imagination.

Comment se forment ces antitoxines? Elles sont d'autant plus abondantes dans le sang des animaux que ceux-ci ont reçu plus de toxine, d'où l'idée très naturelle que l'antitoxine dérive de la toxine par une transformation produite dans le corps. Les propriétés si semblables de la toxine et de l'antitoxine venaient à l'appui de cette supposition. De plus, quand on cesse d'injecter de la toxine aux animaux, l'antitoxine diminue peu à peu dans leur sang, comme si la matière d'où elle provient n'était plus renouvelée. Une conséquence de cette hypothèse, c'est que la quantité d'antitoxine dans le sang doit être en proportion de la toxine introduite. Si donc on saigne fréquemment les animaux immunisés, sans leur injecter de nouvelle toxine, la provision d'antitoxine devra s'épuiser rapidement. Avec M. Vaillard nous avons vu qu'il n'en est rien; on peut retirer en très peu de temps, à un lapin vacciné contre le tétanos, un volume de sang égal au volume total de celui qui circule dans son corps, sans que le pouvoir antitoxique du sérum baisse sensiblement. L'antitoxine se reproduit donc au fur et à mesure qu'on la puise. Et d'ailleurs, une autre expérience

que nous avons faite avec M. Vaillard prouve qu'il n'y a pas proportionnalité entre la toxine injectée et l'antitoxine produite. Avec la même dose de toxine donnée aux animaux, on peut obtenir un sérum plus ou moins actif, suivant la façon dont on l'administre. Prenons deux lapins de même poids et immunisons-les contre le tétanos ; quand leur résistance est déjà notable, injectons-leur la même quantité de toxine (103 c. c.) dans l'espace de deux mois, en donnant à l'un, tous les jours, une faible quantité, et à l'autre, de temps en temps, des doses plus fortes. Dans le même temps, nos deux animaux ont reçu le même volume de poison ; le premier en 33 petites injections, le second en 9 grandes. Le sérum de celui aux faibles doses neutralise, *in vitro*, 150 parties de toxine et possède un pouvoir préventif de cent milliards, le sérum de celui aux doses massives ne neutralise pas 25 parties de toxine et son pouvoir préventif ne dépasse pas cinq cent mille. La manière de donner la toxine n'est pas indifférente, et la quantité de l'antitoxine dans le sang n'est pas proportionnelle à la dose introduite. Avec des petites doses répétées, nous avons obtenu des sérums antitétaniques dont l'activité dépasse un trillion, et cela dans un temps relativement court. Il semble que la toxine agisse comme un excitant sur les cellules qui sécrètent l'antitoxine.

Cette idée que l'antitoxine est un produit cellulaire trouve un appui dans l'intéressante constatation de M. F. Klemperer, qui a vu que le jaune de l'œuf de la poule immunisée est antitoxique, tandis que le blanc ne l'est pas. Quelles sont les cellules du corps qui préparent ces antitoxines ? C'est une question trop peu avancée pour être exposée ici.

L'expérience, dans laquelle le pouvoir antitoxique se manifeste avec le plus de netteté, est celle où l'on mélange le sérum antitétanique avec la toxine. Versons dans une série de verres un volume connu d'une toxine très active (qui tue une souris à la dose de 1/1000e de cent. cube) et ajoutons dans chacun des quantités variables du sérum antitoxique dont nous parlions tout à l'heure, et dont le pouvoir préventif égale un trillion. Une partie de ce sérum suffit à rendre inoffensives 900 parties de toxine ; un demi c. c. du mélange injecté à un cobaye ne lui donne pas le tétanos, bien qu'il ne renferme qu'un dix-huit centième de c. c. de sérum. Le poison paraît donc neutralisé comme dans une réaction chimique, où une quantité donnée d'un corps sature une quantité donnée d'un autre. Les choses ne se passent pas avec cette simplicité. D'abord, rien n'est plus difficile que de saisir le point exact de la saturation. M. Buchner a déjà vu qu'un mélange qui n'agit pas sur la souris est actif sur le cobaye. Un mélange de 900 parties de toxine et d'une de sérum est inoffensif à la dose d'un demi c. c. pour 8 cobayes sur 10 ; mais il en est

2 dans le lot qui prendront un tétanos plus ou moins sévère et se comporteront comme des réactifs plus sensibles, en montrant qu'il y a encore du poison libre dans la liqueur. Diminuons la proportion de toxine et mêlons 500 parties de toxine avec une de sérum. Un demi c. c. de ce nouveau mélange ne produit aucun effet, mais 3 c. c. donneront le tétanos. Il n'y a pas là la netteté d'une réaction chimique, soit que nous manquions d'un réactif suffisant pour nous indiquer le point exact de saturation, soit peut-être qu'il n'y ait pas de saturation et que toxine et antitoxine continuent à exister côte à côte.

Les expériences suivantes, que nous avons faites avec M. Vaillard, tendent à prouver qu'il en est ainsi. Nous injectons à cinq cobayes neufs 1/2 c. c. du mélange : toxine 900 parties, sérum 1 partie; aucun ne prend le tétanos. A cinq autres cobayes, de même poids, ayant les meilleures apparences de santé, mais qui ont été immunisés quelque temps auparavant contre le vibrion de Massaouah, nous donnons le même liquide, à la même dose ; ils auront le tétanos. Bien plus, de semblables cobayes pourront être rendus tétaniques avec 1/3 de c. c. d'un mélange de 500 parties de toxine pour 1 de sérum. Des cochons d'Inde qui reçoivent d'abord 1 c. c. de sérum préventif, actif au trillionième, c'est-à-dire une quantité capable de les immuniser des milliers de fois, puis une dose mortelle de toxine tétanique, restent bien portants dans les conditions ordinaires. Plusieurs d'entre eux prendront le tétanos, si on leur injecte ensuite des produits microbiens tels que ceux du bacille de Kiel, du *bacterium coli*, et d'autres bactéries. La toxine n'est donc pas détruite puisqu'elle donne le tétanos, même après plusieurs jours, aux cobayes dont on modifie la résistance.

De même, une quantité de sérum antidiphtérique, amplement suffisante à préserver des cobayes neufs contre une dose mortelle de toxine, ne retarde pas la mort des cobayes, de même poids, qui ont subi des inoculations antérieures dont ils sont parfaitement rétablis. Et cependant si l'antitoxine détruisait la toxine, la même quantité de sérum serait efficace chez tous les cobayes du même poids.

Ces faits montrent l'influence que peut avoir une maladie antérieure, qui ne laisse pas de traces apparentes, sur la réceptivité à l'égard des virus et sur la sensibilité vis-à-vis des substances toxiques. Leur explication naturelle n'est-elle pas dans l'action du sérum sur les cellules plutôt que sur la toxine? Les cellules bien vivaces des cobayes neufs répondent à la stimulation du sérum et sont comme indifférentes à la toxine, tandis que celles des cobayes déjà impressionnés par les produits microbiens ne lui résistent pas.

Notre démonstration serait plus persuasive, si nous arrivions à séparer la toxine de son mélange avec l'antitoxine. Les propriétés très

voisines de ces deux substances rendent le problème difficile à résoudre. Les toxines et les antitoxines du tétanos et de la diphtérie se comportent de la même façon en présence des divers agents et des réactifs. Mais la séparation peut être faite pour d'autres toxines.

MM. Calmette, Phisalix et Bertrand ont montré que le sérum des animaux immunisés contre le venin des serpents est antitoxique ; il agit sur le venin comme le sérum antitétanique sur le poison du tétanos. Le mélange de sérum antivenimeux et de venin est inoffensif, quand il est fait en proportions convenables : on lui rend toute sa toxicité en le chauffant à 70°. A cette température, l'antitoxine est altérée et le venin ne l'est pas. La chaleur agit sur le mélange des deux substances comme si chacune était seule. Il paraît donc que le venin était resté intact à côté de l'antitoxine, ou, tout au moins, qu'il avait contracté avec elle une union bien instable.

De tout ce qui précède, nous sommes portés à conclure que les antitoxines agissent sur les cellules. Un sérum préventif contre une toxine met en jeu des actions cellulaires, tout comme le sérum préventif contre un virus vivant. Peut-être même les cellules qui détruisent les microbes sont-elles aussi celles qui élaborent les antitoxines ?

Nous avons rappelé, au commencement de cette note, que le sérum d'un animal vacciné contre un microbe protège quelquefois contre un autre, et que les sérums préventifs contre un virus vivant n'étaient pas toujours spécifiques. Jusqu'ici, au contraire, les sérums antitoxiques ont été envisagés comme rigoureusement spécifiques, chacun d'eux n'agissant que sur une toxine déterminée. Le fait que l'antitoxine tétanique n'a aucune influence sur le poison diphtérique et réciproquement, a toujours été mis en avant pour prouver cette spécificité. La découverte de nouvelles antitoxines a élargi le champ de l'expérimentation. J'ai constaté que le sérum antitétanique n'était pas sans action sur le venin de serpent, et j'ai confié le soin d'examiner cette question à M. le Dr Calmette qui étudie, dans mon laboratoire, la sérum-thérapie des venins. Les résultats obtenus sont intéressants au point de vue général qui nous occupe.

Le sérum d'un cheval sain, mélangé à du venin de cobra, n'empêche nullement celui-ci d'agir, tandis que le sérum d'un cheval immunisé contre le tétanos rend inoffensif le venin auquel on l'ajoute. Ce sérum antitétanique, injecté avant le venin, retarde beaucoup la mort et l'empêche même, s'il est donné à doses répétées. Il y a cependant bien peu de ressemblance entre le venin des serpents, qui tue par asphyxie, en un temps très court, et le poison tétanique qui ne manifeste son action qu'après une période d'incubation.

Le sérum antitétanique est antitoxique vis-à-vis du venin, mais le

sérum antivenimeux ne l'est pas à l'égard de la toxine tétanique. Un lapin vacciné contre le venin prend le tétanos et, fait plus surprenant, un lapin immunisé contre le tétanos succombe si on lui donne une dose de venin très peu supérieure à celle qui tue un lapin neuf.

Le sérum des lapins neufs n'a aucune action sur le venin, celui des lapins vaccinés contre la rage est antivenimeux à un haut degré. Mélangé au venin *in vitro*, il le rend inoffensif; injecté préventivement, il protège contre l'envenimation. Des lapins, vaccinés contre la rage, suppportent des doses 4 et 5 fois mortelles de venin. N'est-il pas surprenant de voir qu'en rendant un lapin réfractaire à la rage, on lui donne du même coup l'immunité contre les morsures de serpent?

Le sérum antivenimeux rend les lapins plus résistants à l'abrine, et le sérum anti-abrique a aussi une action sur les venins. Le sérum antidiphtérique, mélangé à l'abrine, ne tue plus les lapins qu'avec un long retard. Assurément, le sérum antitétanique est beaucoup plus efficace contre le poison du tétanos que contre les venins; mais ce ne sont là que des questions de plus ou de moins. Il ne paraît pas probable que des sérums, d'origines si diverses, exercent sur le venin de cobra une même action chimique : nous admettons, plus volontiers, qu'ils agissent tous sur les cellules, en les rendant insensibles, pour un temps, à l'envenimation.

Je pourrais donner encore d'autres exemples de l'action d'une antitoxine sur plusieurs poisons. Ceux dont je viens de parler nous montrent, je crois, sous un aspect nouveau cette question, déjà si attrayante, de la sérum-thérapie.

REVUES ET ANALYSES

SUR LA FIXATION DE L'AZOTE ATMOSPHÉRIQUE

REVUE CRITIQUE

Les questions de symbiose prennent une importance de plus en plus grande dans la physiologie et la médecine. Les lecteurs des *Annales* les ont vues apparaître dans les travaux de Vaillard et de ses collaborateurs sur le tétanos, de Roux et de ses collaborateurs sur la diphtérie, de Metchnikoff sur le choléra. Il est clair qu'elles s'étendront à d'autres domaines, et probable qu'elles envahiront le champ presque entier de la pathologie, car rares sont les maladies qui ne mettent en jeu qu'une seule action microbienne, et dans lesquelles on ne soit pas en droit de soupçonner des phénomènes de symbiose ou d'association. L'influence si manifeste de la réceptivité individuelle n'a peut-être pas d'autre explication. Physiologiquement, deux individus de la même espèce doivent se ressembler et réagir de même. Les différences ne peuvent provenir que de la symbiose de ces êtres avec des êtres différents, qui habitent le plus ordinairement le canal digestif, et qui, en imprimant à la digestion des mêmes aliments des allures différentes, habituent les cellules de leur hôte à des nourritures variables, qu'elles traduisent par une résistance plus ou moins grande vis-à-vis des influences utiles ou nocives. Semblables par nature, nous devenons ainsi dissemblables par fonctionnement, et voilà peut-être un des points où se révèle l'importance de la formule que je ne cesse d'opposer aux théories qui admettent une digestion normale et physiologique : *Il n'y a pas de digestion, il y a des digestions*, parce que les interventions microbiennes qui en font partie varient d'un individu à l'autre[1].

1. Je voudrais évoquer à ce sujet un souvenir personnel, qu'on me permettra d'autant plus de citer qu'il n'est pas à l'honneur de mon courage. Lorsque M. Metchnikoff faisait les expériences sur le choléra dont il a rendu compte dans le t. VII de ces *Annales*, plusieurs médecins et diverses personnes de son laboratoire, entraînés par son exemple et celui de M. Rochefontaine, celui de M. de Pettenkofer, etc., avaient absorbé des cultures virulentes du vibrion de Koch sans en ressentir aucun effet bien fâcheux. Je n'ai jamais suivi ces bons exemples. Je me disais qu'en raison des digestions différentes de chacun des expérimen-

Quoi qu'il en soit, nous voilà en présence de questions nouvelles, plus complexes que celles que nous avons étudiées jusqu'ici. La physiologie d'un microbe est déjà difficile à écrire : que sera-ce lorsqu'il y aura dans un même milieu deux microbes dont les actions physiologiques s'influencent mutuellement. Il n'est pas inutile, dans cet ordre d'idées, et pour rassembler sur ces questions le plus de lumière possible, de passer en revue quelques-uns des phénomènes de symbiose que la science a déjà enregistrés et appris à connaître. Il m'a paru qu'on pouvait essayer une synthèse intéressante en examinant les divers modes de fixation de l'azote atmosphérique dans la végétation.

Le mot de symbiose a été prononcé dès l'origine à propos de la fixation de l'azote par les nodosités des racines de légumineuses, au sujet desquelles nous avons publié, il y a cinq ans (V. t. III, p. 82) une *Revue critique*. Ces nodosités avaient été décrites en 1687 par Malpighi, et Woronin, en 1866, y avait découvert des formes allongées ou renflées aux extrémités, qu'il avait considérées comme pathologiques; de Vries, au contraire, en 1877, y avait vu des réserves nutritives, physiologiquement produites par la plante mère. Mais s'il en était ainsi, on pouvait se demander pourquoi tous les pieds n'en possédaient pas, et, à cette question si naturelle, de Vries ne faisait pas de réponse. C'est Hellriegel qui, après avoir vu, dans un même vase de culture artificielle en terre stérile, prospérer les pieds de légumineuses qui portaient des nodosités, et rester chétifs les pieds qui n'en avaient pas, eut la première idée d'une relation entre l'absorption de l'azote et la présence des nodosités. Pour arriver à la notion de symbiose, que fallait-il de plus? montrer que la matière de ces nodosités était inoculable, et avait ainsi toutes les propriétés d'un être vivant. C'est là l'idée maîtresse du fameux mémoire qu'il a consacré, avec Wilfarth, à la fixation de l'azote atmosphérique par les légumineuses.

Toutefois, même après ce mémoire, la notion de symbiose restait encore très vague. Ce qui était bien démontré, c'était que la fixation de l'azote résultait de la coexistence du développement simultané de la bactérie et de la plante. Mais comment se faisait cette fixation. La plante, à elle seule, en était incapable. La bactérie, quand on eut réussi à la cultiver seule, s'en montra également incapable, ou du moins les seules expériences, dues à M. Beyerinck, dans lesquelles on

tateurs, ce qui avait réussi à l'un pouvait ne pas réussir à l'autre, et je me demandais même, avec un peu d'anxiété, si je devais décourager les savants qui marchaient dans cette voie, en leur montrant ses dangers possibles, ou au contraire laisser librement la science étendre ses conquêtes. J'ai eu raison de me taire, puisque M. Metchnikoff est arrivé à établir, au sujet des associations microbiennes dans le choléra, une notion beaucoup plus claire que celles que j'avais dans l'esprit, et dont on pourra tirer des indications thérapeutiques.

ait pu constater une absorption d'azote, la laissaient singulièrement douteuse. Comment la plante et la bactérie unies pouvaient-elles faire ce qui n'était au pouvoir ni de l'une ni de l'autre, quand elles étaient séparées. La science a tâtonné longtemps dans cette direction. Elle a montré que le tissu des nodosités était plus riche en azote que le reste de la plante, que ce n'était pas au moment de leur formation, mais au moment de leur destruction que ces nodosités rendaient service à leur hôte, qu'à ce moment les bacilles qui avaient formé la nodosité étaient dégénérés, et avaient pris des formes renflées et volumineuses, remplies d'un protoplasma réfringent, qu'on appelle des bactéroïdes, et que la plante trouvait dans ces bactéroïdes l'azote assimilable dont elle avait besoin. Je résume en ces quelques mots ce qu'il y a de plus net et de mieux démontré dans l'histoire déjà touffue des nodosités des légumineuses. Il semble bien en résulter que c'est le bacille qui assimile l'azote. Mais la question reste la même : quelles sont les conditions et le mécanisme de cette fixation? et pourquoi le bacille semble-t-il avoir besoin de la plante pour la réaliser?

Pour trouver une réponse à cette question, il faut regarder du côté des expériences de M. Winogradsky, sur les organismes fixateurs d'azote. Ce savant est parti, comme on sait, d'un point de vue tout autre que ses prédécesseurs. S'il y a, s'est-il dit, dans le sol, des bactéries capables à elles seules de fixer l'azote atmosphérique, comme l'a dit le premier M. Berthelot, elles doivent pouvoir vivre et se cultiver dans des milieux totalement débarrassés d'azote combiné. L'expérience lui a montré qu'il y en avait en effet de telles; il les a isolées avec son habileté ordinaire, et il a constaté, comme fait assez imprévu, que si elles pouvaient se passer de nourriture azotée autre que l'azote de l'air, il leur fallait en échange de grandes quantités de nourriture hydrocarbonée. Elles détruisent beaucoup de sucre pour assimiler peu d'azote.

Mais ici, il faut distinguer. Le microbe fixateur d'azote, isolé par M. Winogradsky, est anaérobie. S'il peut se développer au contact de l'oxygène présent dans le sol, c'est qu'il trouve à côté de lui des êtres aérobies lui créant une atmosphère réductrice, et prenant évidemment leur part des matériaux nutritifs qu'ils rencontrent. Le rapport entre l'azote assimilé et le sucre disparu doit donc dépendre des conditions d'aération. Mais, chose singulière, ce rapport varie au rebours de ce qu'on pouvait croire; on pouvait s'attendre à le voir diminuer, lorsque le microbe fixateur vit à côté d'autres microbes qui brûlent le sucre sans fixer d'azote. Il augmente au contraire dans ces conditions. Le rapport entre l'azote assimilé et le sucre disparu dépend des conditions d'aération. Il y a 2,5 à 3 d'azote assimilé pour 1000 de sucre détruit quand l'aération est complète; 2 à 2,5 quand l'aération

est faible ; 1,4 en culture anaérobie en présence de l'azote pur. Cela témoigne que l'azote n'est pas un aliment de prédilection pour la plante, puisqu'elle en garde d'autant moins, pour la même quantité de sucre détruit, qu'on le lui donne plus pur, ou, ce qui revient au même, qu'elle a besoin, pour absorber la même quantité d'azote, de détruire d'autant plus de sucre qu'on lui supprime plus le contact de l'oxygène et des êtres qui le consomment. On voit poindre, ici, une nouvelle question de symbiose encore trop confuse pour que nous insistions.

Le gain d'azote dépend non seulement du degré d'aération, mais encore du rapport entre le glucose alimentaire et la quantité d'azote ammoniacal qu'il faut introduire dans le mélange nutritif pour commencer la culture. Ce rapport doit être plus grand que 150 pour qu'il y ait gain d'azote. S'il y a trop d'azote ammoniacal, l'azote gazeux n'est plus absorbé.

En somme, nous voyons qu'une bactérie capable d'absorber l'azote ne le peut qu'à de certaines conditions assez étroites, dont nous connaissons quelques-unes : 1° il faut que le milieu de culture soit aéré ; 2° il faut qu'il y ait une matière alimentaire à détruire en quantités notables, égalant au minimum 350 fois le poids de l'azote assimilé dans le cas du glucose et de la bactérie de M. Winogradsky[1] ; 3° le poids du sucre doit être supérieur à 150 fois le poids de l'azote ammoniacal du milieu. Une étude plus approfondie révélera sans doute d'autres conditions de succès : celles-ci suffisent pour qu'on puisse comprendre que la bactérie des légumineuses soit capable d'absorber de l'azote dans de certaines conditions de nutrition et pas dans d'autres, sur la plante et pas à l'extérieur, qu'elle n'ait manifesté aucune puissance d'absorption dans les premières expériences de M. Beyerinck, et qu'elle en ait montré une, faible il est vrai et encore douteuse, dans les dernières, faites en lui fournissant un milieu nutritif plus approprié que dans les précédents essais. Enfin l'énormité de la consommation de l'aliment hydrocarboné, comparé au poids d'azote fixé, nous amène à croire que si la bactérie des légumineuses rend en effet à la plante le service de lui préparer de l'azote assimilable aux dépens de l'azote de l'air, elle lui emprunte en échange la matière hydrocarbonée que la plante fabrique aux dépens de ses organes verts. Dans ce cas, la symbiose, réduite à ses éléments essentiels, a donc la formule

1. En présence de ce chiffre élevé, on a pu se demander si l'azote combiné dont M. Winogradsky observait l'apparition dans ses cultures, et qu'il attribuait à l'absorption de l'azote gazeux, ne proviendrait pas de l'azote organique que tous les sucres contiennent, et dont il est à peu près impossible de les débarrasser, même au prix de nombreuses cristallisations. Il est difficile de tomber au-dessous de 0mg,3 d'azote pour 1 gramme de sucre ou de 3/10000. Mais ce chiffre est dix fois plus faible que la proportion entre l'azote fixé et le sucre détruit dans les expériences de M. Winogradsky. Et d'ailleurs, ce savant a toujours fait des essais à blanc, propres à le mettre en garde contre cette cause d'erreur ou d'illusion.

suivante : la plante et la bactérie prennent dans l'air, l'une, l'aliment hydrocarboné sous forme d'acide carbonique, l'autre l'aliment azoté sous forme d'azote, et elles échangent leurs produits.

Il ne serait pas difficile de signaler, dans les faits déjà nombreux publiés au sujet des bactéries des légumineuses, des notions en rapport avec cette conception générale du phénomène de la symbiose. Nous retrouverions l'utilité de l'aération pendant la culture, la nécessité reconnue d'une petite quantité d'azote à l'origine, l'inutilité d'une dose plus grande, le caractère nocif d'une dose exagérée. De même, en se tournant du côté des bactéries du sol, on pourrait trouver dans les travaux de M. Berthelot, de M. Frank, de MM. Gautier et Drouin, des faits d'accord avec ceux dont M. Winogradsky a fait la synthèse : l'utilité d'une certaine dose d'azote initiale, les inconvénients d'une dose trop élevée, la nécessité d'une certaine quantité de matière organique hydrocarbonée combustible. Peut-être pourrait-on tirer de là l'explication de quelques-unes des irrégularités ou de quelques-uns des faits contradictoires relevés par ces savants et qui laissaient l'opinion indécise. Mais ce serait forcer la note que d'appliquer, aux bactéries des légumineuses ou à d'autres, des notions fournies par les bactéries de Winogradsky. Tout ce que je voulais faire, c'est d'éveiller des idées de comparaisons, et d'indiquer la voie dans laquelle on a des chances de trouver la solution des difficultés pendantes. Si je ne me trompe, la pathologie des associations microbiennes a elle-même à tirer des lumières de ces rapprochements, tellement naturels qu'il faut s'étonner qu'ils n'aient pas encore été faits.

II

Nous allons en retrouver de la même nature en arrivant à la fixation de l'azote atmosphérique par les algues, telle qu'elle a été mise en lumière par les travaux de MM. Schloesing fils et Laurent. Comme celles de MM. Hellriegel et Wilfarth, ces expériences diffèrent des expériences antérieuresde M. Berthelot en ce que la fixation de l'azote s'y est faite dans les plantes, et non dans la masse du sol. Mais si, comme celles de M. Hellriegel et Wilfarth les expériences de MM. Schloesing fils et Laurent sont probantes au point de vue de la réalité de la fixation, elles restent aussi muettes sur la question de mécanisme.

Dans leurs essais, les algues qui étaient intervenues étaient un mélange d'espèces; fait plus grave, elles n'étaient jamais débarrassées de bactéries. C'était cet ensemble complexe qui avait été présent partout où il y avait eu fixation d'azote. A la vérité, les algues semblaient nécessaires à la manifestation du phénomène, car lorsqu'on empêchait leur végétation en maintenant la culture à l'obscurité, comme l'avait

fait Frank, ou en couvrant la culture d'une couche de sable fin, comme MM. Schloesing fils et Laurent, on n'avait aucune fixation, alors qu'il s'en produisait une dans le même milieu, lorsque les algues pouvaient s'y implanter. Mais de ce que les algues semblaient nécessaires, il n'en résultait pas qu'elles fussent seules actives, de même qu'il ne résultait pas de ce que les bactéries ne fixaient pas d'azote en l'absence des algues, qu'elles ne fussent pas nécessaires quand les algues étaient là. Deux êtres vivant en symbiose peuvent faire, unis, ce dont ils sont incapables quand ils sont séparés. Rien ne disait que dans des milieux pauvres comme ceux qu'il faut employer dans de pareilles expériences, la bactérie ne puisse vivre que si l'algue lui fournit constamment l'aliment organique qu'elle fabrique constamment aux dépens de la lumière et de l'acide carbonique de l'air, et cette explication avait pour elle des arguments de fait et des arguments théoriques.

En premier lieu, la fixation de l'azote avait été surtout manifeste dans des cultures où les algues avaient été surtout formées d'un mélange de *nostocs*, et formaient à la surface du sol une couche de consistance gélatineuse. Ces nostocs, on le sait, sont des algues à paroi épaisse, formée surtout d'un hydrate de carbone voisin des gommes et des celluloses des lichens. Quelques-uns de ces nostocs restaient en débris envahis par les bactéries. On retrouvait donc là les caractères et les possibilités d'une association microbienne. Par contre, il y avait eu une expérience où il était développé une algue à peu près pure, le *microcoleus vaginatus*, et où on n'avait pas observé de fixation d'azote. Il se pouvait évidemment que ce résultat fût dû à la nature de l'algue : toutes les bactéries n'ont pas les mêmes propriétés; on ne peut pas demander à des algues de se ressembler davantage. Mais il pouvait se faire aussi, comme l'avaient finement remarqué MM. Schloesing et Laurent, que « la pureté de la culture soit défavorable à la fixation de l'azote, si, par exemple, celle-ci était le résultat du concours de plusieurs êtres » ; et justement il arrivait que cette culture, où il n'y avait pas eu de fixation, n'avait pas été ensemencée avec de la délayure de terre de jardin qu'avaient au contraire reçue les cultures ayant fixé de l'azote gazeux.

Pour résoudre la difficulté, il y a un moyen, c'est d'ensemencer, dans un milieu assez pauvre en matière organique pour que les bactéries de M. Winogradsky ne puissent intervenir, une ou plusieurs algues pures, de voir si à elles seules elles fixent de l'azote, et, si elles n'en fixent pas, de chercher si elles en fixent lorsqu'elles sont associées à des bactéries banales du sol. C'est ce qu'à fait M. Kossowitch [1], mais non sans rencontrer quelques difficultés.

1. *Bot. Zeitung : Originalabhandlungen*, 1re p. fasc. V. 1894.

La plus grande vient de ce que la culture des algues à l'état de pureté n'est pas chose commode, même après les travaux de M. Beyerinck [1]. Les algues sont très sensibles au changement de milieu, souffrent de toute transplantation, aiment à être serrées les unes contre les autres, et ne se prêtent pas à la séparation des espèces; ce sont en apparence des plantes très sociables, aimant le contact d'autres espèces. On connaît leur association dans les lichens : dans les vases de culture elles se développent plus abondamment au contact des bactéries. Leur isolement et leur purification sont difficiles. M. Kossowitch est pourtant arrivé à en isoler une espèce, voisine du *cystococcus* (Nœgeli) et du *chlorella vulgaris* (Beyerinck), qu'il a pu cultiver dans des flacons d'Erlenmeyer, sur une couche de sable, imbibée d'une solution nutritive contenant, par litre : 0gr,25 de phosphate bibasique et 0gr,25 de phosphate tribasique de potasse, 0gr,37 de sulfate de magnésie, 0gr,2 de chlorure de sodium, et des traces de phosphate de fer et de sulfate de chaux.

Quand on n'ajoute pas de nitrate, la culture est impossible, alors même qu'on y introduit du sucre. En revanche, quand on introduit du nitrate, et M. Kossowitch employait du nitrate de chaux, la culture se fait; la surface et l'intérieur du sable se recouvrent d'une couche verte qui grandit d'abord à vue d'œil, puis s'arrête au bout de quelques semaines. Il va sans dire qu'on fait circuler dans le matras un courant d'air privé d'ammoniaque, mais contenant un peu d'acide carbonique. Quand la culture semble s'arrêter, on lui donne un nouvel essor en y ajoutant du nitrate de chaux. Par contre, l'addition des autres sels nutritifs est alors sans effet. Cela prouve que la plante a besoin d'azote combiné et ne s'accommode pas d'azote libre. On constate en effet que la quantité d'azote contenue dans la culture ne varie pas, dans les limites d'erreur du procédé de mesure. Il faut donc conclure, avec M. Kossowitch, que « dans ces cultures, le *cystococcus*, en l'absence d'autres organismes, n'a pas fixé d'azote libre ». Cette conclusion résulte de douze expériences faites avec des quantités variables de nitrate de chaux, et avec ou sans addition de sucre, qui semble plutôt défavorable que favorable à la culture des algues, quand elles sont pures. On a ajouté dans 2 cas des bactéries des nodosités de pois, sans que rien ait été changé au résultat.

Il en est tout autrement quand on ajoute au sable de la délayure de terre de jardin, et qu'on laisse envahir la culture par des bactéries banales, et d'autres espèces d'algues que le *cystococcus* ensemencé. Voici un tableau résumant les 10 expériences de M. Kossowitch. Les 10 matras étaient partagés en 5 groupes de 2, dont un recevait à l'ori-

1. *Bot. Zeitung*, 1890, p. 625.

gine $0^{gr},75$ de dextrose, et dans la suite 1 gramme de dextrose en 5 fois. L'autre matras ne recevait pas de sucre. L'ensemencement était différent d'un groupe à l'autre, et le tableau donne l'indication des espèces qu'on y relevait au microscope, la culture faite. Il donne aussi les quantités d'azote trouvées à la fin de la culture. La quantité d'azote originaire était de $2^{mgr},7$.

Groupes.	Êtres développés.	Sans sucre.	Avec sucre.
1	*Cystococcus*, *phormidium*, bactéries du sol, mucédinées	7.1^{mgr}	9.5^{mgr}
2	*Cystococcus* et bactéries	3.1	8.1
3	*Stichococcus* et bactéries	2.3	2.7
4	Nostoc, grosses algues rondes, *Scenedesmus*, bactéries du sol	?	19.1
5	Nostoc, forme analogue au *cylindrospermum*, bactéries	8.8	25.4

Sauf dans un cas, où la fixation a été nulle, il y a donc eu de l'azote fixé dans toutes ces expériences, et même en proportions parfois assez grandes. Il y en a eu dans les matras sans sucre, bien qu'elle ait été plus marquée dans les matras avec sucre, mais même dans ces derniers, il ne faut pas penser à l'intervention des bactéries de M. Winogradsky, du moins avec les propriétés que nous a fait connaître ce savant, car la proportion d'azote fixé, pour 1 gramme de sucre disparu, est beaucoup plus grande dans les expériences de M. Kossowitch où elle dépasse 2 0/0, au lieu du maximum de 4/1000 réalisé par M. Winogradsky. De plus nous retrouvons encore ici cette fixation plus abondante dans le cas des nostocs, qui, dans les expériences de M. Kossowitch comme dans celles de MM. Schlœsing et Laurent, formaient une couche gélatineuse à la surface et dans l'épaisseur de la culture.

Nous voilà donc conduits à cette conclusion que c'est l'association des algues et des bactéries, ou, si on veut, l'association de certaines algues et de certaines bactéries qui préside à la fixation de l'azote gazeux. Mais la façon dont a été ordonné notre exposé éclaire en outre la question de mécanisme, et conduit à penser que la symbiose dans ce cas se fait comme dans le cas des bactéries des nodosités des légumineuses, et met en jeu le même rouage que les bactéries de Winogradsky. L'algue fabrique de la matière alimentaire que la bactérie consomme, et dont la destruction lui fournit l'énergie nécessaire à la fixation et à l'organisation de l'azote gazeux de l'atmosphère.

Il est vrai que l'azote et l'oxygène peuvent se combiner théoriquement pour donner de l'acide azotique, surtout en présence de l'eau, parce que cette oxydation de l'azote et l'hydratation de l'acide formé dégagent de la chaleur. Mais il reste encore douteux que cette oxyda-

tion puisse se faire par voie microbienne, sans destruction concomitante d'une énergie étrangère, les deux phénomènes d'organisation et de destruction étant mis en rapport et en état de dépendance mutuelle dans le protoplasma de la cellule vivante. Au moins peut-on remarquer, à l'appui de notre explication, qu'elle laisse aux algues vertes et aux bactéries le rôle qu'on leur connaît : aux algues le rôle de producteur de matière organique aux dépens de l'acide carbonique et de la lumière solaire, aux bactéries leur rôle d'agent de destruction, ayant besoin de brûler de grandes quantités de matière pour fabriquer celle qui est nécessaire à la construction de leurs tissus et à l'entretien de leur protoplasma.

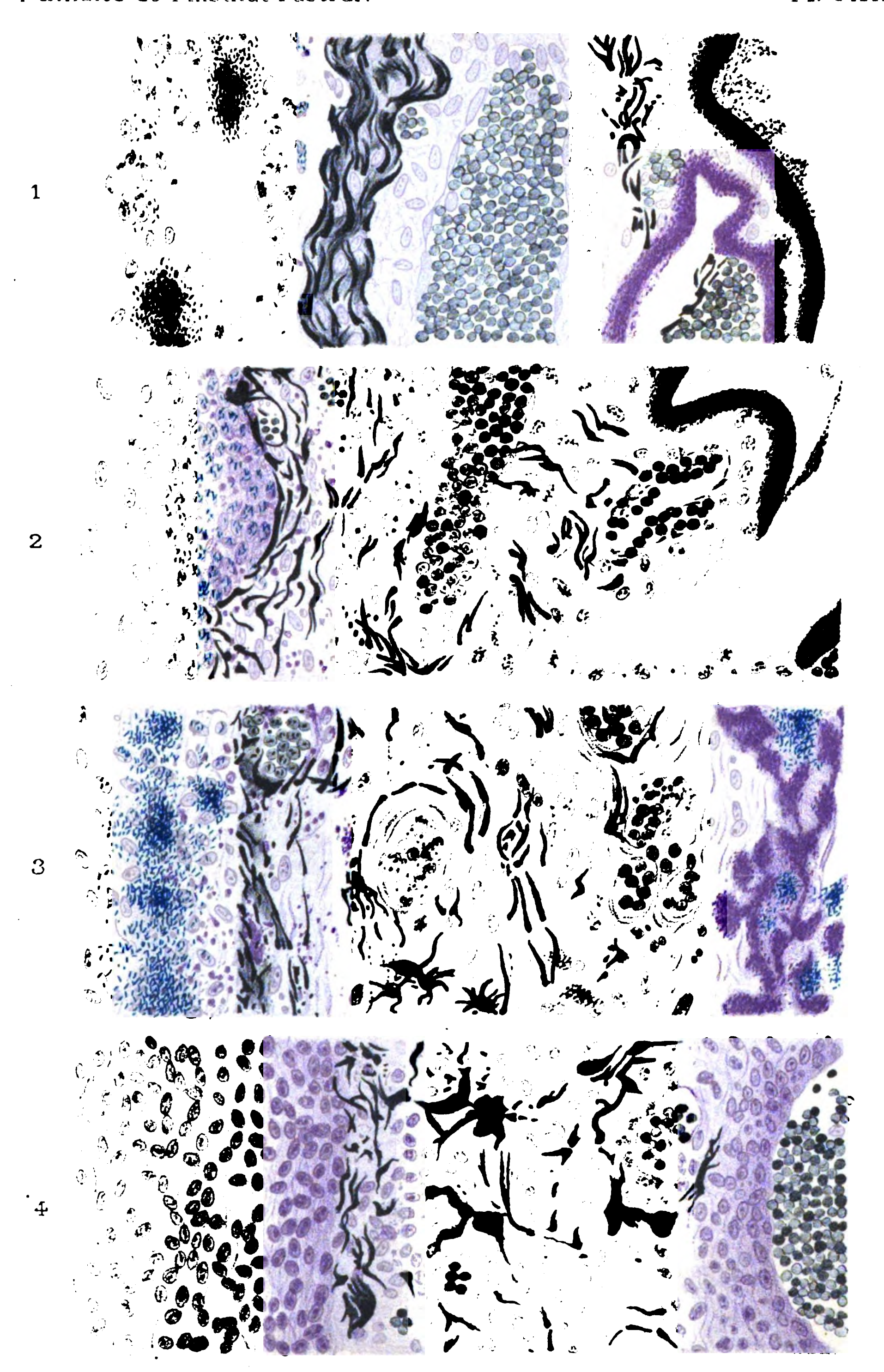
Les trois grands phénomènes de la fixation de l'azote gazeux que nous venons d'examiner ont donc, de ce fait, une formule commune. Ils exigent tous la consommation d'une énergie étrangère. Ils se rapprochent, sous ce point de vue, de la fixation de l'azote gazeux par des effluves électriques, mise en lumière par M. Berthelot. Par contre ils se séparent d'autres expériences de ce savant, les premières qui aient été publiées au sujet de la fixation de l'azote gazeux par voie microbienne, et dans lesquelles la fixation de l'azote gazeux n'a été accompagnée de la destruction d'aucune matière organique, car le sol des expériences, formé de kaolin ou de sable lavé, n'en renfermait que des traces ; ce sont là les phénomènes que M. Berthelot appelle avec justesse les phénomènes de fixation de l'azote par le sol. En recommençant ces expériences, M. Schlœsing n'en a pas retrouvé les résultats. Mais cela ne prouve rien au point de vue théorique. Il se peut, si les bactéries interviennent, qu'elles n'aient pas été les mêmes dans les terres de M. Berthelot et dans celles de M. Schlœsing. Les conditions du phénomène ne sont pas encore établies. Toutefois, la formule de cette fixation nous apparaît d'ores et déjà comme différente de celle des cas qui précèdent, et nous pouvons dès lors la laisser pour le moment en dehors de notre cadre, dans lequel nous nous proposions surtout de faire l'étude des phénomènes de symbiose.

En résumé, nous voyons deux grands phénomènes naturels s'expliquer par un échange de bons procédés entre une plante sans chlorophylle et une plante verte, celle-ci fabriquant de la matière organique hydrocarbonée dont elle fait part à celle-là, qui, en retour, lui fournit le composé azoté dont la plante verte a besoin ; et c'est ainsi qu'à côté de la loi : « Mangez-vous les uns les autres » qui est la grande loi conservatrice de la nature, nous trouvons la loi plus douce : « Aidez-vous les uns les autres ». Mais elle est plus rarement en jeu, et il semble vraiment que son fonctionnement soit plus délicat.

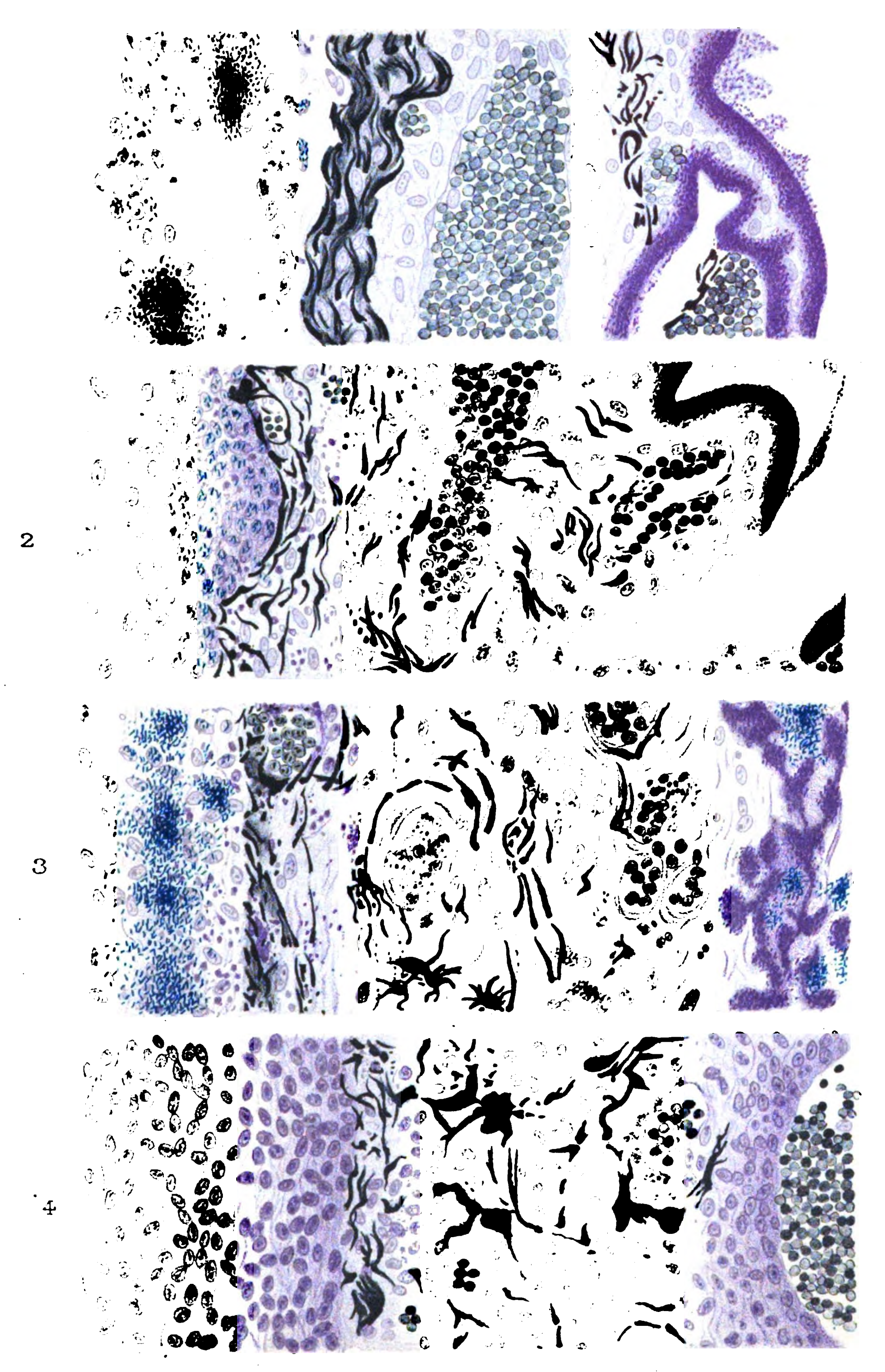
E. Duclaux.

Le Gérant : G. Masson.

Sceaux. — Imprimerie Charaire et Cie.



V. Roussel del et lith. Imp. A. Lafontaine & Fils, Paris.



V. Roussel del. et lith. Imp. A. Lafontaine & Fils, Paris.

ANNALES

DE

L'INSTITUT PASTEUR

ÉTUDES SUR LA FERMENTATION LACTIQUE

Par M. E. KAYSER.

Depuis le mémoire classique de M. Pasteur, l'attention des savants s'est souvent portée sur la fermentation lactique, et à la notion d'un ferment unique, présidant au dédoublement d'une molécule de sucre en deux molécules d'acide lactique, s'est peu à peu substituée la conception d'êtres très nombreux, jouissant tous plus ou moins de la propriété de produire de l'acide lactique aux dépens des sucres, mais différant par leurs formes, leurs conditions d'existence, la proportion et la nature de l'acide lactique formé. On trouvera l'histoire de quelques-uns de ces êtres divers dans les mémoires de MM. *Boutroux, Pirotta* et *Riboni*, *Grotenfelt*, *Hueppe*, *Hayduck*, *Lindner*, *Marpmann*, *Beyerinck*, *Krueger*, *Schardinger*, *Tate*, *Escherich*, *Bischler*, *Nencki*, *Percy-Frankland*, *Lister*, *V. Storck*, *Weigmann*, de *Freudenreich*, et cette liste est loin d'être épuisée.

Il m'a paru que, à côté de ces histoires particulières, il y avait utilité à essayer un travail d'ensemble, dans lequel on étudierait simultanément et par les mêmes méthodes des ferments d'origines diverses, de façon à voir si les différences qu'on avait relevées jusqu'ici étaient foncières ou si elles tenaient à des conditions de culture et d'éducation. Avant d'assigner à tel ou tel ferment des propriétés permettant de le caractériser, il faut d'abord s'assurer si ces propriétés sont contingentes ou stables. C'est ce que j'ai essayé de voir pour divers ferments lactiques.

Ceux que j'ai étudiés d'une façon spéciale sont au nombre de 15; je les ai désignés par les lettres de l'alphabet; les fer-

ments *d*, *e*, *f*, *g* m'ont été gracieusement fournis par MM. Nencki et de Freudenreich; le ferment *s* est celui de la mammite contagieuse des vaches, je le dois à l'obligeance de M. Nocard[1].

Tous les autres ont été purifiés par les méthodes ordinaires de microbiologie.

J'ai comparé d'abord ces ferments dans divers milieux solides et liquides; pour les milieux solides, j'ai adopté une échelle empirique de 1 à 10 pour caractériser l'épaisseur et l'aspect de la colonie; voici les observations faites à cet égard.

Ferment a. — Origine : Crème de Normandie; forme, sur l'eau de touraillons gélatinisée, une strie mince représentée par le nombre 3, sur gélose nutritive un tracé faible avec stries écailleuses représenté par 2; donne avec le lait un caillé très ferme, très dense; fait cailler le lait à la température de 28 à 30° au bout de 20 à 24 heures; se présente dans le jus d'oignons en chaînes de 4, 6 et 8 articles.

Ferment b. — Origine : Crème de la Vendée; forme sur l'eau de touraillons gélatinisée une strie bien continue, représentée par 6; sur gélose nutritive un tracé linéaire représenté par 5; donne avec le lait un caillé très ferme; fait cailler le lait à la température de 28 à 30° au bout de 24 heures; se présente dans le jus d'oignons sous la forme de chaînes plus longues que *a*, et montrant jusqu'à 12 articles.

Ferment c. — Origine : Crème de Larzac; forme sur l'eau de touraillons gélatinisée une strie mince représentée par 3; sur gélose nutritive un tracé opalin représenté par 3; donne avec le lait un caillé très ferme; fait cailler le lait à la température de 28 à 30° au bout de 24 heures; présente dans le jus d'oignons des chaînes de 3 à 4 articles, plus petits que ceux des ferments *a* et *b*.

Ferment d. — *Bac. Guillebeau, c*, forme sur l'eau de touraillons gélatinisée une traînée de bougie en saillie, représentée par 9; sur gélose nutritive un voile épais crémeux représenté par 10; donne un caillé granuleux avec beaucoup de sérum; fait cailler le lait à 28° dans les 36 heures; montre dans le jus d'oignons des chaînes de 2 à 4 articles, plus gros que ceux des ferments *a*, *b*, *c*.

Ferment e. — *Bac. Bischleri*, forme sur l'eau de touraillons

1. Voir sa description dans le t. I de ces *Annales*, p. 109.

gélatinisée une strie bien continue représentée par 6; donne sur gélose nutritive un tracé linéaire représenté par 5; donne un caillé granuleux avec rétraction nette; caille le lait à 28° au bout de 84 à 90 heures; montre dans le jus d'oignons des chaînes de 4 à 6 articles qui ont environ 4 μ de long sur 3 μ de large.

Ferment f. — *Bac. aerogenes*, forme sur l'eau de touraillons gélatinisée une traînée de bougie en saillie représentée par 9; donne sur gélose nutritive un voile épais crémeux représenté par 10; donne un caillé granuleux avec rétraction nette; fait cailler le lait à 28° dans les 36 heures; dans le jus d'oignons, il montre des chaînes nombreuses et longues de 10 à 12 articles, un peu plus petits que ceux du ferment *d*.

Ferment g. — *B. de Freudenreich* α, forme sur l'eau de touraillons gélatinisée une strie rugueuse représentée par 8; sur la gélose nutritive un tracé opalin représenté par 3; donne un caillé un peu contracté; fait cailler le lait à 28° dans les 72 à 84 heures; montre dans le jus d'oignons des chaînes très longues de 15 à 18 articles.

Ferment h. — Origine : Infusion de seigle; forme sur l'eau de touraillons gélatinisée, une strie rugueuse représentée par 5; sur gélose nutritive un tracé excessivement mince représenté par 1; donne un caillé très rétracté; fait cailler le lait à la température de 28° dans les 100 à 120 heures; montre dans le jus d'oignons des chaînes de 4 à 5 articles, de la grosseur des ferments *a*, *b*, *c*.

Ferment l. — Origine : Moût de distillerie; forme sur l'eau de touraillons gélatinisée une strie continue représentée par 4; sur gélose nutritive un tracé linéaire représenté par 5; donne un caillé très serré; fait cailler le lait à 28° dans les 30 heures; montre dans le jus d'oignons des chaînes de 2 articles.

Ferment m. — Origine : Moût de distillerie; forme sur l'eau de touraillons gélatinisée une strie mince représentée par 4; sur gélose nutritive un tracé lisse, très mince, représenté par 1,5; donne un caillé très serré; fait cailler le lait à 28° dans les 48 à 60 heures; présente dans le jus d'oignons des chaînes très longues, recourbées, de 12 à 15 articles.

Ferment n. — Origine : Jus de choucroute; forme sur l'eau de touraillons gélatinisée une traînée très épaisse avec pénétration nette représentée par 10; sur gélose nutritive un voile

large, étendu, représenté par 8; donne un caillé avec légère rétraction; caille le lait à 28° dans les 60 heures; montre dans le jus d'oignons des chaînes très longues de 20 articles et plus.

Ferment o. — Origine : Bière belge; présente sur l'eau de touraillons gélatinisée une strie mince représentée par 3, sur gélose nutritive un tracé opalin représenté par 3; donne un caillé ferme, caille le lait à 28° dans les 72 heures; présente dans le jus d'oignons des chaînes avec 20 articles.

Ferment p. — Origine : Bière belge; présente sur l'eau de touraillons gélatinisée une strie rugueuse représentée par 5,5; sur gélose nutritive un tracé faible avec stries écailleuses représenté par 2; donne un caillé très ferme; caille le lait à 28° dans les 72 à 84 heures, montre dans le jus d'oignons des chaînes de 15 à 20 articles.

Ferment r. — Origine : Crème de Copenhague; donne un caillé ferme; fait cailler le lait à 28° dans les 30 heures; présente des chaînes de 6 à 8 articles; dans les milieux liquides, ressemble au ferment *b*.

Ferment s. — B. de la mammite contagieuse des vaches, donne un caillé ferme; fait cailler le lait à 28° dans les 30 heures; se présente dans les milieux liquides sous la forme de coccus isolés, deux par deux ou en chaînettes.

ACTION DE LA CHALEUR

Tous ces ferments ont des propriétés très différentes, ainsi qu'on peut s'en assurer par divers moyens; étudions, par exemple, leur résistance au chauffage en milieu acide.

Dans ce but je me suis servi de pipettes d'ensemencement, très étroites et très effilées à leur partie inférieure, de façon à s'allonger en un petit tube d'environ 2 millimètres de diamètre. Ces tubes, fermés par un tampon de coton et stérilisés au four à flamber, recevaient quelques gouttes d'une fermentation lactique pure et obtenue en l'absence de carbonate de chaux, c'est-à-dire acide. Les cultures qui ont servi à l'expérience avaient de 4 à 5 jours; je n'ai pas titré l'acidité, mais on ne s'écarte pas trop de la vérité, en la considérant comme sensiblement la même pour tous les ferments.

Les pipettes subissaient un chauffage de 5′, 10′, 15′ au bain-marie; sitôt le nombre de minutes écoulé, on les plongeait dans l'eau froide, et on ensemencait 10 c. c. de lait stérile; il n'y avait plus qu'à observer le moment de la coagulation du lait.

Dans le tableau suivant, la lettre D indique qu'il y a eu développement, la lettre M que le lait n'a pas caillé et que le chauffage avait tué le ferment; dans chaque expérience il y avait des laits témoins ensemencés avec les ferments non chauffés pour constater leur vitalité.

	55°		60°		65°
	10′	15′	5′	10′	3′
a	DD	M	M	M	M
b	DD	M	M	M	M
c	DD	M	M	M	M
d	DD	DD	DD	DD	D
e	DM	M	M	M	M
f	DD	M	M	M	M
g	DD	DD	DD	DD	M
h	DD	M	M	M	M
l	DM	M	M	M	M
m	DD	DD	DD	DD	M
n	DD	DD	DM	M	M
o	DD	DD	DD	M	M
p	DD	DD	DD	M	M
r	DD	M	M	M	M
s	DD	DD	DD	DD	M

On voit que les ferments lactiques ne semblent pas avoir la même faculté de résistance à la chaleur. Les ferments *a*, *b*, *c*, *r*, retirés de la crème, semblent plus fragiles, ne résistent pas même à 5′ de chauffage à 60°, tandis que les ferments *g*, *s*, *n*, *m*, *o*, *p* et notamment *d* sont très résistants; c'est d'ailleurs parmi ces derniers que nous trouvons les ferments qui, toutes choses égales ailleurs, donnent un maximum d'acidité.

Cette résistance dépend et de l'acidité du milieu dans lequel les ferments ont été chauffés et de l'acidité ou de l'alcalinité plus ou moins grande du lait qui a servi à l'expérience.

TEMPÉRATURE OPTIMA

Comparons-les maintenant au point de vue du temps qu'ils mettent à cailler un même volume de lait à différentes températures. La comparaison n'est pas parfaite, car la durée de coagulation dépend non seulement du ferment employé, de sa multiplication, de sa plus ou moins rapide croissance aux différentes températures, mais aussi de ce que la dose d'acide nécessaire pour la coagulation diminue à mesure que la température s'élève. Mais, malgré la superposition de ces effets, la méthode de mesure, qui est dans les conditions de la pratique, suffit pour nous révéler des différences profondes entre les divers ferments.

Hueppe avait fixé pour les limites optima de la fermentation lactique 35 à 42°, Liebig 30 à 35°, et Mayer 30 à 40° ; voici celles que j'ai trouvées pour mes ferments :

Le tableau indique, en heures, les temps de coagulation des divers ferments aux températures indiquées sur la première ligne.

	10°	15°	20°	25°	30°	35°	40°	45°
a	»	96h.	48h.	24h.	24h.	24h.	50h.	»
b	»	84	48	36	24	24	30	»
c	»	136	96	60	48	30	30	»
d	»	»	158	72	36	24	12	24
e	»	»	168	132	108	132	»	»
f	»	»	324	60	36	24	12	24
g	»	»	242	96	90	84	»	»
h	»	»	242	168	132	132	»	»
l	»	84	36	36	36	24	20	»
m	»	324	230	84	72	60	30	»
n	»	240	134	72	48	36	36	»
o	»	372	230	84	72	48	48	
p	»	168	108	96	72	60	70	
r	»	84	48	36	30	24	30	

La température du bain-marie a été maintenue constante à l'aide d'un régulateur Etienne.

On voit par là qu'aucun ferment n'a pu cailler le lait, après une durée de 35 jours, à la température de 10° ; il y en a qui n'ont pas agi à la température de 15°.

Les essais aux températures de 40° et de 45° ont duré 8 jours ; les 3 ferments *e*, *g*, *h*, n'ont pas caillé le lait à 40°, mais les tubes, ramenés à 30°, n'ont pas tardé à se cailler.

A la température de 45°, les 3 ferments *d*, *f*, *l*, seuls ont agi ; les tubes des 3 ferments *m*, *o*, *p* reportés à 30° ont caillé, ces trois ferments n'étaient donc pas morts.

Si nous plaçons les ferments *d* et *f* à part, nous voyons que la température optima peut être comprise entre 30 et 35° pour les divers ferments étudiés.

INFLUENCE DE LA DESSICCATION

Les ferments lactiques, mis en gouttelettes sur des bandes de papier stérile, contenues dans des tubes flambés, conservent leur faculté de cailler le lait pendant longtemps.

J'ai préparé trois lots de tubes : le premier lot a été placé à l'étuve à la température de 25° ; le second lot a été conservé au frais, mais recevait l'action directe de la lumière, le troisième lot également maintenu au frais était dans une obscurité complète.

Après trois mois, j'ai versé du lait stérile dans tous les tubes ; tous ont caillé, ce qui prouvait que tous les ferments étaient encore vivants, et que ni la dessiccation ni la lumière n'avaient en rien modifié leurs premières propriétés.

INFLUENCE DES MILIEUX

L'étude chimique des transformations que les ferments lactiques amènent dans les milieux de culture est facile. Les gaz dégagés sont surtout formés d'acide carbonique, surtout lorsqu'on a ajouté du carbonate de chaux pour maintenir le liquide au voisinage de la neutralité. On a cependant quelquefois trouvé de l'azote, de l'hydrogène, et Baginski a obtenu du CH^4 avec le B. *lactis Escherich*. Je dirai tout de suite que dans une fermentation lactique très active faite en présence de carbonate de chaux et installée pour l'étude des gaz, j'ai trouvé exclusivement de l'acide carbonique. Les petites quantités d'azote qui formait le résidu provenaient évidemment de la petite portion d'azote qui reste obstinément dans un liquide qui a séjourné à l'air, et n'abandonne qu'avec beaucoup de résistance le gaz qu'il a dissous.

Les produits non gazeux sont l'acide lactique, l'acide acétique, l'acide formique. On dose les acides volatils par la méthode des distillations fractionnées faites suivant les indications de M. Duclaux. L'acide lactique est séparé par l'éther et pesé à l'état de sel de zinc, de chaux, ou de cadmium. L'acétone, dont il se forme souvent des traces, est appréciée par la combinaison jaune qu'elle forme avec l'hydroxyde de mercure. Enfin l'alcool est dosé au compte-gouttes de M. Duclaux, ou, quand il y en a peu, apprécié par la réaction de l'iodoforme.

Résultats. — Ces méthodes m'ont permis de trouver, comme produits principaux de la fermentation lactique, l'acide lactique et l'acide acétique en proportion variable avec le ferment, la nature du milieu, le mode de culture et diverses autres circonstances que nous examinerons plus loin.

Je n'ai jamais pu constater la présence de l'acide succinique. Il faut signaler des traces d'acide formique, d'acétone et d'alcool éthylique. L'acide formique est en quantités variables, n'arrivant jamais à 1 0/0 de l'acide lactique. L'alcool est en proportions plus grandes, surtout dans les fermentations en présence de craie, et peut atteindre 3 à 4 0/0 du poids de l'acide lactique.

La différence entre l'acidité totale et l'acidité volatile a pu me fournir une idée suffisamment exacte de la quantité d'acide lactique formé; les trois acidités totale, volatile et fixe sont partout exprimées en grammes; il en est de même des autres données analytiques qui en sont susceptibles.

J'ai calculé, pour un grand nombre d'expériences, le rapport qui existe entre l'acidité fixe ainsi obtenue et l'acidité volatile. On le trouvera, dans les tableaux qui suivent, sous le nom de *rapport A*. Nous verrons qu'il est très variable d'un ferment à l'autre.

L'acidité dépend du microbe ensemencé, de la nature du corps fermentescible; de plus, pour une même matière fermentescible, elle est influencée par la durée de la fermentation, l'âge du microbe, le mode d'éducation, le mode de culture, la richesse du milieu en matières azotées et en hydrates de carbone.

Examinons successivement ces diverses influences.

RÉACTION DU MILIEU

Voici, pour trois milieux différents, les chiffres représentant l'acidité totale, l'acidité volatile, l'acidité fixe obtenue par diffé-

rence, ainsi que le rapport entre l'acidité fixe et l'acidité volatile; les résultats obtenus sont représentés par le graphique I[1].

Premier milieu.

Solution de lactose 5 0/0 et peptone 2 0/0 — durée 25 jours.
Acidité en acide lactique par litre.

Ferment.	Ac. Tot.	Ac. Vol.	Ac. Fixe.	Rap. A.
a	3.32	0.165	3.16	19.1
b	3.82	0.355	3.47	9.7
c	3.51	0.178	3.38	18.7
d	1.72	0.131	1.59	12.1
e	5.31	0.620	4.69	7.5
f	1.40	0.785	0.62	0.8
g	6.59	0.293	6.30	21.6
h	4.26	0.301	3.86	12.8
l	5.00	0.368	[illegible].47	12.1
m	5.34	0.523	4.98	9.3
n	5.31	0.308	5.00	16.2
o	6.08	0.254	5.73	22.5
p	5.65	0.381	5.27	13.7

Deuxième milieu.

Lait peptonisé. — Durée de la fermentation : cinq semaines.
Acidité en acide lactique par litre.

Ferment.	Ac. Tot.	Ac. Vol.	Ac. Fixe.	Rap. A.
a	5.54	0.91	4.63	5.0
b	3.91	1.15	2.76	2.4
c	4.91	1.00	3.91	3.9
d	3.24	2.13	1.11	0.5
e	6.59	1.84	4.75	2.5
f	2.24	2.20	0.04	—
g	15.80	1.75	14.05	8.0
h	6.20	2.13	4.07	1.9
l	5.00	2.33	2.67	1.1
m	10.50	1.87	8.63	4.6
n	12.30	1.93	10.37	5.3
o	14.70	1.94	12.76	6.4
p	17.50	2.34	15.16	6.5

Même lait non peptonisé.

m	7.60	—	—	—
n	8.20	—	—	—

1. Dans tous les graphiques l'acidité représentée se rapporte au litre.

Troisième milieu.

Solution de maltose 5,6 0/0, *peptone* 2 0/0 — *durée cinq semaines.*

Acidité en acide lactique par litre.

Ferment.	Ac. Tot.	Ac. Vol.	Ac. Fixe.	Rap. A.
b	1.66	0.133	1.55	13.7
d	0.83	0.446	0.38	0.85
e	2.34	0.675	1.67	2.40
g	4.05	0.217	3.83	17.6
h	2.68	0.724	1.96	2.7
m	4.57	0.246	4.32	17.5
n	5.33	0.344	4.99	14.5
o	3.88	0.254	3.63	14.3
p	3.67	0.285	3.39	11.9

La comparaison de ces trois tableaux, ou l'examen du graphique I, nous montre que les acidités totale, volatile et fixe peuvent varier énormément, et non seulement en passant d'un ferment à l'autre dans le même milieu, mais encore pour le même ferment dans différents milieux.

Nous voyons que l'acidité fixe est très élevée dans le lait peptonisé, c'est que dans ce milieu les ferments lactiques trouvent les aliments azotés sous une forme très assimilable ; la richesse saccharine est, en effet, approximativement la même dans les divers milieux étudiés ; nous constatons d'ailleurs une grande différence entre les acidités totales obtenues avec les ferments *m* et *n* dans le lait et le même lait peptonisé.

Si nous comparons la solution de lactose à la solution de maltose, nous trouvons avec cette dernière proportionnellement plus d'acides volatils et en conséquence moins d'acides fixes. L'acidité volatile varie beaucoup, du simple au quintuple, et le rapport A est très variable.

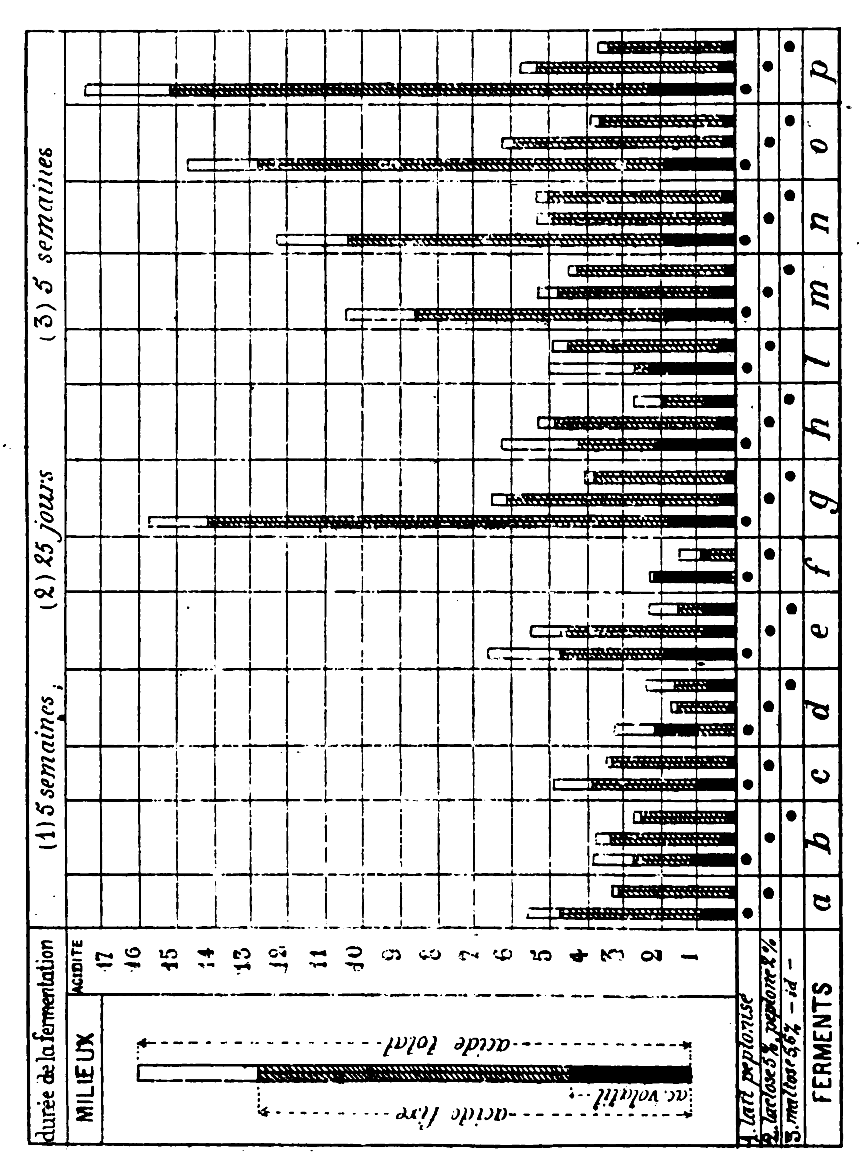
Nous voyons que les ferments lactiques sont des êtres très sensibles à la nature du milieu et à la qualité des aliments ; ils préfèrent toujours les milieux naturels tels que le jus d'oignons, le jus de topinambours, aux milieux minéraux.

INFLUENCE DE LA DURÉE DE LA FERMENTATION VARIATIONS DE L'ACIDITÉ

Pendant la durée d'une fermentation lactique, le rapport entre l'acidité totale et l'acidité volatile est-il toujours le même?

S'il varie, comment varie-t-il? Les différents ferments lactiques se comportent-ils de la même façon? Telles sont les questions que j'ai cherché à résoudre.

En étudiant l'influence des acides et des alcools sur la fer-



GRAPHIQUE I.

mentation lactique, Hayduck est arrivé à conclure qu'au commencement de la fermentation le ferment se multiplie beaucoup, sans donner lieu à la production d'acide.

M. Richet a également remarqué que dans certaines fermentations lactiques, on pouvait constater vers le 3e jour une diminution dans l'acidité totale.

Mais pour éclaircir davantage la question, il fallait faire des prises d'échantillons très rapprochées et assez fréquentes, afin de voir se manifester d'une façon nette les variations se produisant d'un jour à l'autre. On ne devait pas non plus se contenter de doser uniquement l'acidité totale. On ne serait, en effet, nullement renseigné sur l'allure générale de la fermentation.

Poursuivons au contraire cette variation de l'acidité pendant un grand nombre de jours, pendant des semaines et des mois, en effectuant à des intervalles déterminés, à l'aide de pipettes flambées, des prises suffisamment fortes pour doser à la fois l'acidité totale et l'acidité volatile, que nous exprimerons comme toujours en acide lactique par litre.

Moût de bière dilué.

	Ferment *m*.		Ferment *p*.	
	Acidité.	Augmentation par jour.	Acidité.	Augmentation par jour.
	—	—	—	—
4e jour	0.86	0.40	0.94	0.47
7e —	1.76	—	2.18	—
12e —	2.77	0.20	4.06	0.37
15e —	2.83	—	4.72	0.22
19e —	3.12	0.07	5.34	0.15
26e —	3.43	0.04	5.81	0.07
33e —	4.13	0.10	6.08	0.04
36e —	4.33	0.07	6.12	0.01

Nous voyons que l'acidité totale augmente continuellement pour les deux ferments. Nous voyons également que l'augmentation journalière décroît régulièrement depuis le 10e jusqu'au 36e jour; ceci est surtout net pour le ferment *p* où cette augmentation tombe de 0gr,47 à 0gr,01. Ce même ferment *p* dans un milieu plus approprié, dans du lait préalablement peptonisé, a produit une acidité totale environ triple de celle ci-dessus, et aussi régulièrement croissante, sauf quelques légères oscillations, jusqu'au 43e jour où elle est la plus forte. L'acidité fixe varie

dans le même sens, ce qui veut dire que l'acidité volatile n'a varié que dans de faibles limites. Le rapport A est resté à peu près constant.

Tous les ferments lactiques se comportent-ils de la même façon? N'y en a-t-il pas qui, à un moment donné, comme l'a déjà signalé M. Richet, font disparaître l'acide produit, qui les gêne, pour en produire ensuite de nouvelles quantités?

Pour le savoir, j'ai fait un très grand nombre d'expériences avec les différents ferments que j'avais à ma disposition. J'ai vu que, sous ce point de vue, on pouvait les classer en deux grands groupes, ceux qui font disparaître partiellement, à un certain moment, l'acidité formée, et ceux chez lesquels l'acidité croît sans discontinuer, ou est tout au plus sujette à de légères oscillations.

Dans le premier groupe il faut ranger les ferments de laiterie, de la crème, *a*, *b*, *c*, *r*, auxquels il convient de rattacher le ferment *s* de la mammite contagieuse des vaches, les ferments *d* et *f*; tous les autres, ceux de la distillerie, de la brasserie, du jus de choucroute doivent être compris dans le 2ᵉ groupe.

Nous avons donné un exemple emprunté à ce second groupe. En voici un emprunté au premier. Le ferment *b* a été ensemencé dans de l'eau de touraillons peptonisée, additionnée de quantités croissantes de lactose par litre. Voici la marche de l'acidification.

	Acidité en acide lactique par litre.		
	A. — + 0.5 0/0 lactose. —	B. — + 0.250 0/0 lactose. —	C. — + 0.125 0/0 lactose. —
Après 1 jour	1gr,340	1gr,090	1gr,008
— 2 —	1 ,197	1 ,176	—
— 3 —	1 ,124	1 ,124	—
— 4 —	1 ,134	1 ,194	—
— 5 —	1 ,145	1 ,090	—
— 6 —	1 ,050	—	—
— 7 —	1 ,113	—	—
— 8 —	1 ,090	—	—
— 9 —	1 ,090	—	—
— 10 —	1 ,082	—	—
— 11 —	1 ,071	—	—

Nous voyons que, pour le ferment *b* de la crème, l'acidité augmente rapidement, puis diminue et semble soumise à des

oscillations continuelles; elle se maintient finalement à un niveau à peu près constant, soit de 1gr,080 par litre. Chose singulière, ce titre définitif est à peu près le même pour les 3 matras qui renfermaient pourtant à l'origine des quantités de sucre différentes, variant de 1 dans le matras C à 4 dans le matras A.

Le matras C a été arrêté au bout de 24 heures, le matras B au bout de 5 jours; les deux cultures sont pures, les liquides ne réduisent plus la liqueur de Fehling; le matras A, le plus riche en sucre, a fermenté pendant 11 jours. A ce moment, j'y remarque un petit îlot de *penicillium glaucum* et j'arrête l'expérience.

Les liquides B et C sont soumis à la distillation fractionnée d'après la méthode de M. Duclaux; je trouve de l'acide acétique avec un peu d'acides supérieurs; je l'exprime en acide lactique.

Nous en avons ainsi pour B : 0gr,085 par litre.
C : 0gr,080 —

Ce qui fait, en acide fixe, par différence
pour B : 1gr,010
C : 0gr,923

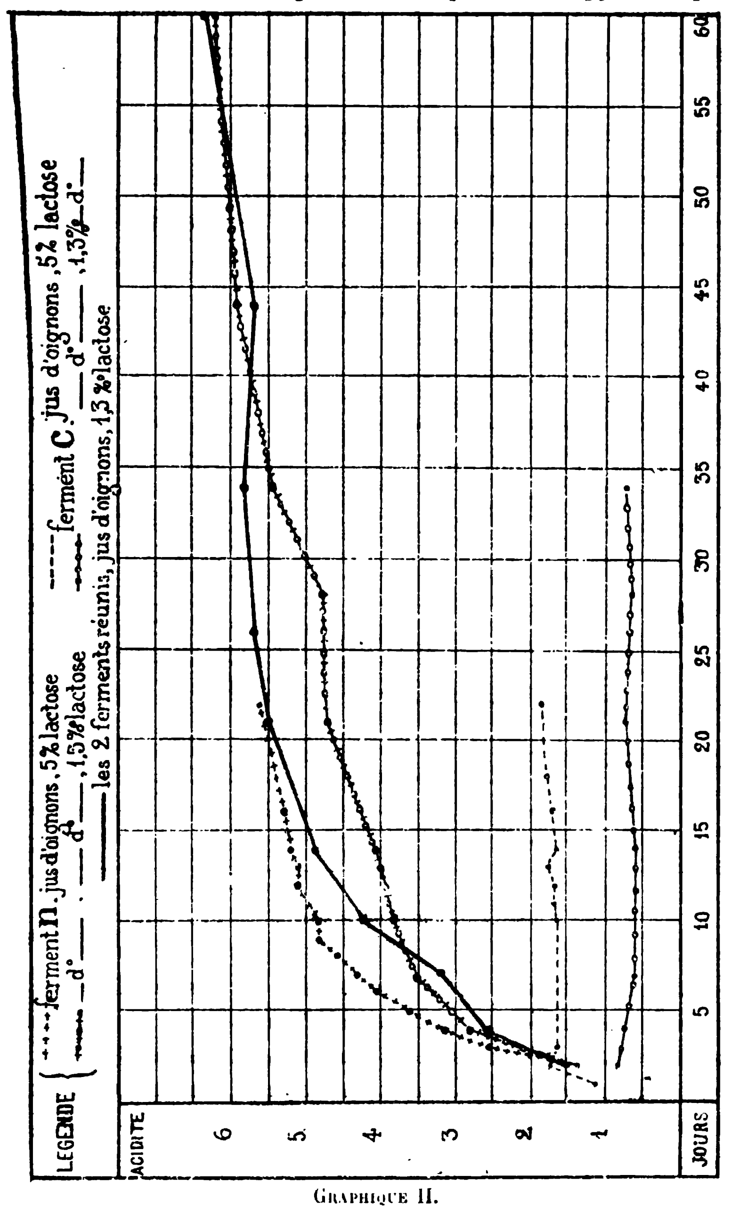
et, pour les rapports A, pour B : 11,8
C : 11,5

c'est-à-dire sensiblement le même nombre. Les deux liquides ont donc fermenté de la même façon.

Entre ces deux formes pour ainsi dire extrêmes de la marche de l'acidification, on relève des formes intermédiaires dont les fig. II et III peuvent donner une idée. Les courbes de la fig. II indiquent la marche progressive de l'acidité produite par les ferments *c* et *n* dans du jus d'oignons additionné de 1gr,3 et de 5 grammes de lactose par litre. On voit qu'avec le ferment *n*, l'acidité s'élève vite et reste ensuite à peu près constante, sauf quelques variations, comme si le microbe procédait simultanément à la fabrication de nouvel acide et à la destruction de l'acide formé. Avec le ferment *c*, dans le même milieu, l'acidité reste plus faible et à peu près constante.

Les tracés de la fig. III donnent d'autres exemples de la marche de l'acidification. La conclusion générale qui résulte de l'ensemble de ces faits peut se résumer en ceci : il y a d'ordinaire un moment où la combustion de l'acide formé commence, ce moment est celui où le ferment commence à se sentir mal à

l'aise dans le milieu de culture. Pour quelques ferments, la gêne commence dès l'origine, ils ne peuvent supporter que la

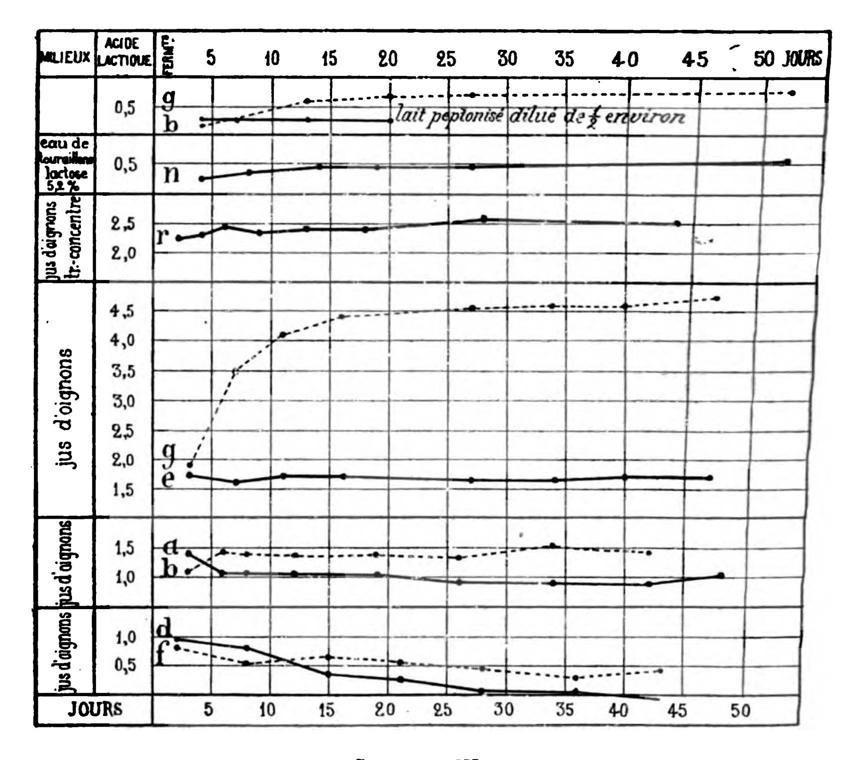


GRAPHIQUE II.

Dans ce graphique, il faut lire jus d'oignons avec 5 0/00 de lactose, au lieu de 5 0/0.

présence de faibles quantités d'acide, ils élèvent donc très peu l'acidité du milieu. Les autres l'élèvent beaucoup, mais par là ils se créent à eux-mêmes des conditions défavorables, et dès ce moment, ils brûlent ou détruisent l'acide formé.

VARIATIONS DE L'ACIDITÉ POUR QUELQUES FERMENTS



GRAPHIQUE III.

Par quoi se traduit cette combustion? nous allons le voir en étudiant séparément la marche de l'acidité fixe et de l'acidité volatile avec le ferment *s* de la mammite contagieuse.

Ce ferment *s* passe très nettement par un maximum, comme on le voit par les deux expériences ci-après, donnant toujours l'acidité en acide lactique par litre.

Expérience A. — *Jus d'oignons.*

	A. T.	A. V.	Ac. Fixe.	Rap. A.
Après 4 jours	0.581	0.259	0.322	1.250
— 8 —	0.817	0.439	0.378	0.860
— 20 —	0.559	0.492	0.067	0.013

Expérience B. — *Jus d'oignons.*

	A. T.	A. V.	Ac. Fixe.	Rap. A.
Après 11 jours	0.720	0.368	0.352	0.95
— 15 —	0.698	0.419	0.279	0.66
— 21 —	0.585	0.491	0.094	0.19
— 28 —	0.473	0.410	0.063	0.15
— 46 —	0.900	0.867	0.033	0.04

On voit que l'acide fixe diminue, tandis que l'acidité volatile augmente; finalement il ne reste plus d'acidité fixe ; tout le sucre semble transformé en acides volatils (acide acétique), ce qui a lieu, comme nous le verrons plus loin, dans les cultures en surface.

INFLUENCE DE L'AGE DE LA SEMENCE

Lorsqu'on prélève des bacilles dans des cultures d'âge différent et qu'on les ensemence dans un même milieu fermentescible, montrent-ils toujours la même activité? Quelle est l'influence de l'âge de la semence?

M. Grimbert nous a montré, pour le *bacillus orthobutylicus*, que l'âge des microbes mis en jeu peut avoir une influence capitale sur la marche d'une fermentation.

J'ai fait plusieurs expériences dans le même ordre d'idées et j'ai trouvé pour les ferments lactiques des faits tout à fait analogues à ceux signalés par M. Grimbert.

Quelques essais préliminaires m'ayant montré que les ferments lactiques, conservés dans un milieu liquide additionné de craie, conservent très longtemps leur activité et leur puissance coagulante sur le lait, qu'en revanche, leur conservation sur milieu solide les fait plus rapidement dégénérer, j'ai dû, pour étudier la variation d'activité avec l'âge, conserver les semences

dans un milieu sans craie, et, pour éviter l'influence du changement de milieu, les réensemencer dans un liquide identique à celui qui les avait conservées. A divers intervalles, d'un mois, de quatre mois, on faisait une culture nouvelle et on comparait les résultats. Comme terme de comparaison, on faisait simultanément chaque fois une culture dans le même milieu additionné de craie.

Le tableau suivant résume mes résultats. On voit que pour

GRAPHIQUE IV.

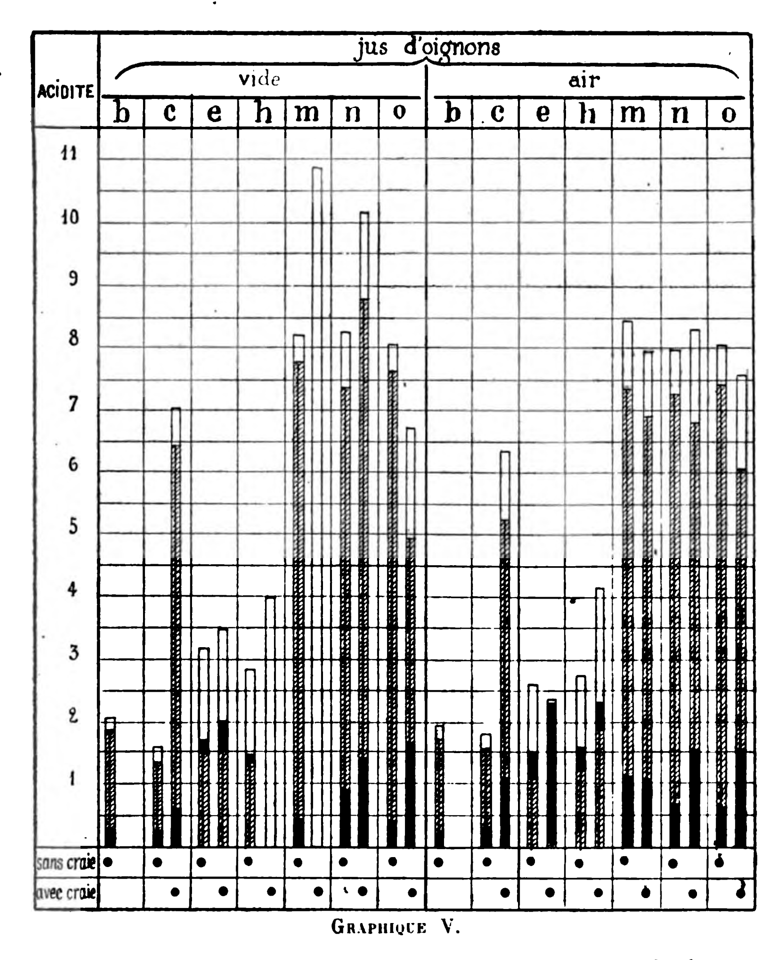
Les proportions de glucose sont en millièmes et non en centièmes comme cela est indiqué par erreur.

les deux ferments dans le jus d'oignons, c'est la semence âgée d'un mois qui est la plus active, tant en présence de la craie qu'en son absence. Dans l'eau de navets, au contraire, c'est la semence jeune qui se comporte le mieux. Partout, la fermentation en présence du carbonate de chaux est plus active qu'en son absence.

INFLUENCE DE L'AIR

Les ferments lactiques sont-ils aérobies ou anaérobies ?

D'après les recherches de M. Hueppe, la présence de l'air est nécessaire à la fermentation lactique ; M. Richet a constaté que l'oxygène peut l'activer beaucoup ; M. Mayer a vu, au contraire que la fermentation lactique était possible en l'absence d'air.



GRAPHIQUE V.

Oppenheimer a trouvé, en opposition avec Baginsky, que l'absence d'oxygène donnait lieu à plus d'acide lactique et à moins d'acides volatils ; c'est ainsi qu'il n'a trouvé que de l'acide lactique dans les fèces des nourrissons.

Nous allons voir que tous les cas sont possibles, et que le ferment lactique considéré intervient en première ligne.

J'ai stérilisé 80 c.c. de jus d'oignons avec ou sans craie dans des tubes étirés ; le liquide y occupait une longueur de 11 centimètres, de sorte que la culture peut être considérée comme ayant eu lieu en profondeur.

Ces tubes ont été ensemencés avec les ferments *b*, *c*, *e*, *g*, *h*, *m*, *n* et *o* ; la moitié est fermée par un bouchon de coton ; l'autre moitié est scellée à la lampe, après y avoir fait le vide préalablement à la trompe à eau.

Ils sont abandonnés pendant six semaines à l'étuve et analysés.

On voit, en comparant les mêmes ferments dans les deux moitiés du tableau suivant ou du graphique V, qu'ils sont en moyenne plus actifs lorsqu'ils agissent dans le vide qu'en culture profonde au contact de l'air.

	VIDE						AIR					
	Avec craie.			Sans craie.			Avec craie.			Sans craie.		
	AT	AV	AFi	AT	AV	AFi	AT	AV	AFi	AT	AV	AFi
	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
b	—	—	—	2.030	0.195	1.835	—	—	—	1.973	0.205	1.768
c	7.054	0.596	6.458	1.635	0.243	1.392	6.358	1.119	5.239	1.804	0.230	1.574
e	3.537	2.056	1.481	3.204	1.713	1.491	2.368	2.308	0.060	2.614	1.514	1.100
g	—	—	—	—	—	—	—	—	—	6.253	0.360	5.893
h	4.011	—	—	2.829	1.439	1.390	4.140	2.291	1.849	2.745	1.543	1 202
m	10.902	—	—	8.204	0.443	7.761	7.954	1.050	6.904	8.487	1.105	7.382
n	10.180	1.402	8.778	8.261	0.849	7.412	8.309	1.537	6.772	7.978	0.694	7.284
o	7.776	1.650	6.126	8.091	0.414	7.677	7.580	1.510	6.070	8.034	0.617	7.417

La présence de l'air égalise davantage les deux cultures avec et sans craie, en diminuant l'activité de la première pour tous les ferments, sauf pour *o*, pour lequel elle l'augmente légèrement. Il est à remarquer que pour ce ferment *o*, et contrairement aux autres, la fermentation en présence du carbonate de chaux est moins active qu'en son absence.

Nous avons observé le même fait, pour le ferment *n*, à différentes reprises.

Il importe de faire remarquer la grande différence de l'acidité fixe produite par le ferment *c* dans les tubes avec et sans craie, dans le vide et dans l'air ; il n'est pas moins curieux de voir que l'acidité volatile est partout plus élevée que l'acidité fixe, aussi bien dans le vide que dans l'air pour les deux ferments *e* et *h*.

CULTURES EN SURFACE ET EN PROFONDEUR

Les cultures faites au contact de l'air dans l'expérience précédente l'avaient été dans des tubes profonds et étroits : il était donc indiqué de rechercher ce qui arrive quand on fait des cultures en large surface et en petite profondeur. Je me suis servi pour cela des ferments *b*, *m*, *n* et *o* des essais précédents, que j'ai cultivés comparativement dans des matras larges et dans des tubes longs et étroits. La fig. VI résume quelques-unes de mes expériences. Les liquides de culture ont été du jus d'oignons additionné de $7^{gr},53$ et de $10^{gr},54$ de glucose par litre; de l'eau de touraillons, contenant $13^{gr},3$ de glucose et 5 grammes de peptone par litre; enfin, de l'eau de choux.

On voit que pour le ferment *m*, qui ne figure que dans un essai, l'acidité totale est à peu près la même, mais que l'acidité volatile est plus grande et l'acidité fixe plus faible en surface et au large contact de l'air. Le rapport A varie de 4,6 à 20,9. Pour le ferment *n*, l'acidité totale dans la culture en profondeur dépasse toujours ce qu'elle est au libre contact de l'air. Le rapport A entre l'acide fixe et l'acide volatil est aussi toujours plus faible en surface. Pour *o*, la culture en profondeur donne plus d'acide dans l'eau de choux, moins dans le jus d'oignons sucré. Pour *b*, dans ce dernier milieu, il n'y a presque pas de différences, et en résumé on voit que les ferments lactiques se comportent de façons très variées vis-à-vis de l'oxygène. Les uns sont plus anaérobies, les autres plus aérobies.

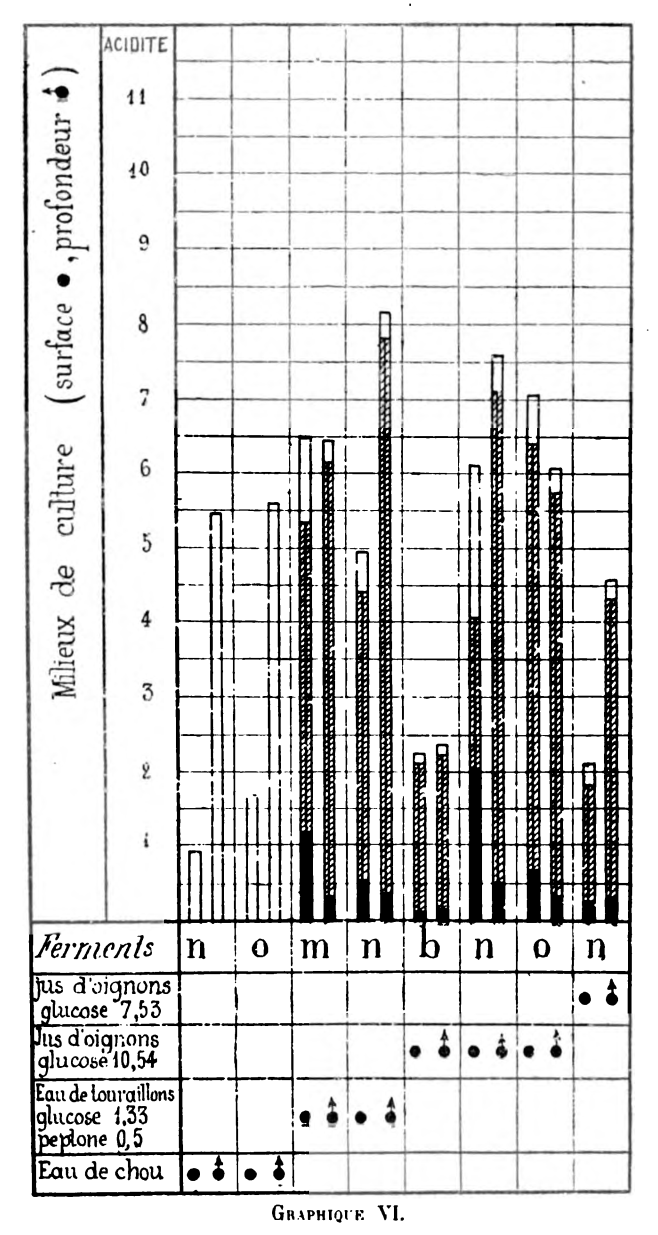
Il est curieux de chercher quel est dans ces deux modes d'existence le rapport entre le sucre disparu et l'acide formé. Ce rapport devrait être l'unité si la transformation se faisait suivant la formule théorique :

$$C^6H^{12}O^6 = 2C^3H^6O^3$$

S'il y a combustion complète d'une partie du sucre, ou d'une partie de l'acide formé, le rapport entre le sucre originel et l'acide trouvé à la fin de la fermentation doit tomber au-dessous de l'unité, et d'autant plus que la combustion est plus vive.

Or on trouve que pour 100 grammes de glucose disparu, *n* a donné, dans les trois derniers essais du tableau, 93,8; 94,0; 95,3 d'acide fixe dans la culture en profondeur, tandis qu'on ne

trouvait respectivement que les nombres 70, 60,9, 62,1 dans la culture en surface.



GRAPHIQUE VI.

Pour] b. nous trouvons les nombres 80,6 en surface et

74,6 en profondeur; pour *o*, de même, les nombres 98,9 et 100. Nous avons vu que ce dernier microbe était presque indifférent à la présence du vide ou à celle de l'air, à la présence ou à l'absence de carbonate de chaux. Pour les autres, la proportion de sucre retrouvée à l'état d'acide fixe est plus grande en profondeur qu'en surface. Dans ce dernier cas, il y a toujours combustion.

INFLUENCE DE LA MATIÈRE AZOTÉE

MM. Richet et Hueppe ont déjà signalé l'influence qu'exerce sur la fermentation lactique la nature de l'aliment azoté, mais ils ne se sont pas demandé d'où provenait cette influence. La matière albuminoïde sert-elle seulement à fournir au ferment l'azote qui lui est nécessaire, ou bien contribue-t-elle pour sa part à la formation de l'acide lactique? Pour répondre à cette question, il fallait d'abord chercher quel était l'aliment azoté le plus assimilable et le plus actif. J'ai trouvé que c'était la peptone.

Le graphique VII résume les expériences relatives à l'influence de la peptone, et met en évidence deux faits principaux :

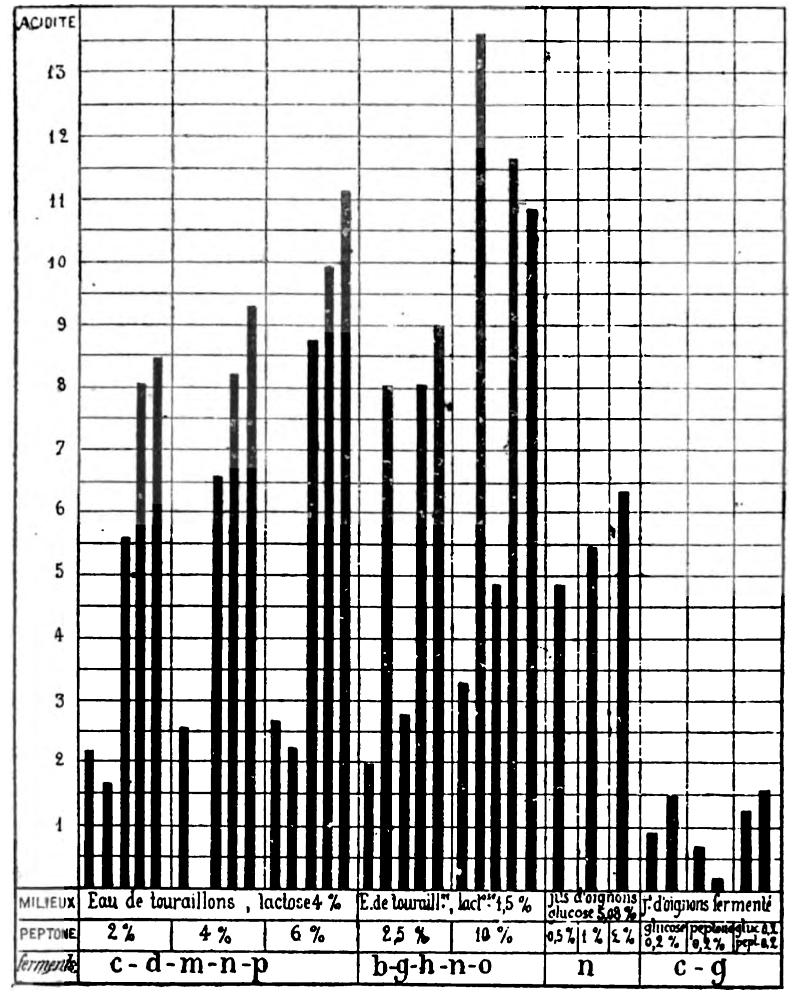
Le premier est que l'addition de peptone augmente toujours le titre acide du milieu de culture, que le ferment soit inerte ou vigoureux. Le second est que le titre acide monte parfois au-dessus du chiffre qui correspond au dédoublement pur et simple de tout le sucre fermentescible contenu dans la liqueur, comme si une portion de cet acide lactique provenait de la peptone. Pour savoir s'il en est réellement ainsi, il n'y avait qu'à cultiver les ferments dans une solution de peptone.

Des solutions à 1 et 2 0/0 de la peptone Chapoteaut, qui ne réduisaient la liqueur de Fehling ni avant le traitement par l'acide chlorhydrique ni après, ensemencées avec divers ferments lactiques, m'ont toujours donné de l'acide lactique, reconnaissable par son sel de zinc.

On aurait pu dire que cette peptone contenait peut-être des substances hydrocarbonées différentes des sucres, et pourtant capables de subir la fermentation lactique. Pour éviter cette objection, j'ai peptonisé du blanc d'œuf en solution chlorhydrique à la température de 30° : le liquide a été neutralisé et

débarrassé du précipité par filtration. La solution contenait 4,40 0/00 d'extrait avec 0,325 0/00 d'azote ou 2,20 0/00 de matières azotées. Elle a été ensemencée avec divers ferments lactiques.

La solution d'albumine peptonisée se trouble bientôt ; la durée de la fermentation a été d'un mois.



GRAPHIQUE VII.

L'examen microscopique montre que les ferments s'y sont bien développés.

Voici les acidités obtenues en acide lactique par litre, dans des tubes contenant 10 c. c. de liquide :

c	0.210	*m*	0.095
e	0.063	*n*	0.325
g	0.137	*o*	0.210

Deux matras contenant plus de liquide avaient été ensemencés avec les ferments *n* et *o*; l'acidité totale du matras *o* était de 0,176 0/00 ou à peu près le douzième de la matière azotée [1]. Le résidu de l'évaporation épuisé par l'éther m'a donné du lactate de zinc, reconnaissable au microscope et par l'oxyde de zinc obtenu par calcination; j'ai transformé le lactate de zinc en lactate de chaux qui est bien plus propre à démontrer la présence d'acide lactique.

Pour voir si les ferments lactiques avaient conservé leur première puissance, j'ai ensemencé comparativement dans du jus d'oignons et dans du lait la semence du matras fermenté avec le blanc d'œuf peptonisé et celle d'une culture ordinaire.

J'ai constaté que la semence provenant de la culture du blanc d'œuf peptonisé fait cailler le lait un peu plus lentement ; j'ai vu aussi que l'acidité obtenue dans le jus d'oignons a diminué.

	Acidité en ac. lact. par litre.	
Semence *n* blanc d'œuf...........	4.664	4gr,598
— —	4.532	
— *n* ordinaire..............		5 ,720

Ainsi le ferment qui a poussé dans l'albumine est resté un ferment lactique.

Un autre blanc d'œuf peptonisé, avec 10,45 0/00 d'extrait, m'a encore fourni des lactates de zinc, avec les ferments *n* et *o*.

L'acidité obtenue par litre était de 0,882 pour le ferment *n*, et de 0,819 pour le ferment *o*.

Un troisième blanc d'œuf peptonisé m'a donné des lactates de zinc avec les ferments *b*, *n* et *o*.

1. Le matras *n* avait pris une teinte jaune foncé et était alcalin; quelques centimètres cubes mis dans un tube à essai avec une trace de carbonate de magnésie et portés à l'ébullition ont donné un dégagement net d'ammoniaque : le tube témoin traité de la même façon n'a rien dégagé.

Le liquide *n* a été soumis à la distillation avec du carbonate de magnésie et j'obtiens 0,043 0/00 d'AzH^3; l'acidité totale était de 0,114 0/00 en acide lactique; la distillation fractionnée a révélé des traces d'acide propionique. J'obtiens du lactate de zinc.

Pour éviter toute objection de nature à faire croire que c'est peut-être la trace de substances hydrocarbonées existant dans l'œuf qui aurait donné lieu à une production lactique, j'ai précipité le blanc d'œuf par l'acide chlorhydrique, j'ai versé le précipité sur un filtre et lavé abondamment avec de l'eau chaude.

Le précipité a été ensuite peptonisé par un peu d'acide chlorhydrique additionné de pepsine; cette solution est neutralisée et stérilisée. J'obtiens des quantités appréciables de lactates de zinc pour les ferments *c*, *e* et *o*.

J'ai enfin fait une dernière expérience avec la fibrine peptonisée.

La fibrine fraîche, bien lavée et très blanche, est mise à digérer à la température de 30° avec une solution diluée d'acide chlorhydrique et de pepsine.

Elle est filtrée et neutralisée : le liquide soumis à l'expérience donne 9,3 0/00 d'extrait avec 1,03 0/00 d'azote ou 6,44 0/00 de matières albuminoïdes.

J'ensemence les ferments *h*, *e* et *n* ; la fermentation dure trois semaines; les matras *e* et *h* sont acides; le matras *e* indique une acidité de 0,315 0/00 ; le matras *n* est jaune et alcalin; j'obtiens partout des lactates de zinc.

Il semble donc nettement démontré que les ferments lactiques sont aptes à faire de l'acide lactique aux dépens de la matière azotée pure; mais ce n'est pas tout.

Du moment qu'ils sont si sensibles à la présence ou à l'absence de la matière azotée, il était à prévoir qu'ils seraient riches en azote ; il fallait donc songer à les recueillir, à les peser et à y doser l'azote, en faisant varier les conditions de l'expérience.

Leur étude à ce point de vue a donné lieu à des conclusions intéressantes.

Il faut d'abord dire que les ferments lactiques, excessivement minces, passent très aisément à travers les pores du papier Berzélius; il y en a qu'on n'arrive jamais à retenir complètement : c'est cette circonstance qui m'a empêché, dans tous les essais qu précèdent, de prendre le poids de ferment comme critérium dei l'intensité de l'action, et à m'adresser uniquement pour cela à la quantité et à la qualité des acides produits.

Première expérience.

J'ensemence les ferments *l* et *p* dans du lait peptonisé, je retiens les deux ferments sur une petite bougie-Chamberland en communication avec une trompe à eau par l'intermédiaire d'un petit flacon.

Les poids des ferments trouvés ont été, après traitement par l'éther pour enlever la matière grasse, par litre :

Pour *l* 0.203 ayant donné une acidité de..... 5.59 0/00 ac. lact.
— *p* 0.683 — — 12.64 —
Ou 1 gramme de ferment a donné pour *l*...... 27.5 gr. ac. lact.
— — — *p*...... 18.5 — —

Deuxième expérience.

Dans cette expérience j'ai cherché à éviter la précipitation de la matière albuminoïde sous l'influence de l'acide lactique, en la précipitant préalablement par le même acide.

Le milieu de culture est le lait peptonisé. Après addition de 0gr,882 d'acide lactique par litre, le lait a été bouilli, filtré, neutralisé et ensemencé avec les ferments *b*, *n*, *o*; les ferments ont été ensemencés en double; la fermentation a duré 2 mois 1/2; l'examen microscopique ne révèle rien autre chose que des ferments lactiques; la filtration a lieu à travers des filtres tarés de papier Berzélius; les ferments *n* et *o* s'y prêtent admirablement, ils sont entièrement retenus : pour *b* j'en ai perdu un peu; le tableau suivant nous indique les acidités produites, le poids du ferment par litre, ainsi que la teneur en azote 0/0 :

	Quantités par litre.				
Ferment.	Poids du ferment.	Ac. Tot. produite.	A. V.	A. Fi.	Azote du ferment.
b 1	0.080	0.878	0.124	0.754	—
» 2	0.062	0.878	0.128	0.750	—
n 1	0.537	9.062	1.210	7.852	—
» 2	0.590	9.744	1.012	8.732	9.9 0/0
o 1	0.500	11.284	1.407	9.877	11.5 0/0
» 2	0.617	9.810	1.012	8.798	10.8 0/0

Les filtres *n* 2 et *o* 2 ont filtré très rapidement; nous trouvons dans ces deux matras une acidité fixe de 8,732 et de 8,798 avec

0gr,590 et 0gr,617 de ferment, ou par gramme de ferment 14gr,8 et 14gr,3 d'acide lactique produit; rapports très voisins et un peu inférieurs à ceux de la précédente expérience, où nous avions considéré l'acidité totale.

Je dois également signaler la forte richesse en azote des ferments : nous trouverons bientôt une relation directe entre la teneur en azote du ferment, la richesse du milieu et les conditions de culture (surface et profondeur).

Rappelons d'abord quelques chiffres d'une expérience que nous avons examinée un peu plus haut.

Eau de touraillons : 13,3 0/00 *de glucose.*

	Acidité en acide lactique 0/00.			
	m.		*n.*	
	Acidité.	Sucre disparu.	Acide fixe.	Sucre disparu.
Culture en profondeur.	6.146	6.80	7.603	8.10
— surface.....	5.340	7.58	4.398	5.48

Comparons maintenant les poids des ferments produits, des acides fixes formés et des sucres disparus ; un accident m'a fait perdre le ferment *m* pour la culture en profondeur.

	Acidité par litre.					
	Ferment *m.*			Ferment *n.*		
	Poids du ferment.	Ac. Fi.	S. D.	Poids du ferment.	A. Fi.	S. D.
Profondeur.	⊤	6.146	6.80	0.386	7.603	8.10
Surface	0.460	5.340	7.58	0.333	4.398	5.48

Nous trouvons que *un* gramme de ferment a fait disparaître

	Sucre.	Acide fixe produit.
m surface..........	16gr,4	11.6
n surface...........	16gr,4	13.2
n profondeur.......	20gr,9	19.7

Troisième expérience.

Le milieu de culture est du jus d'oignons avec 10,54 0/00 en glucose ; il a été ensemencé avec le ferment *n*.

L'examen microscopique montre le ferment plus beau en profondeur.

Quantités par litre.

	Ac. Tol.	A. Vo.	Ac. Fi.	S. disparu.	Poids du ferment.
Profondeur..	7.590	0.490	7.100	7.55	1.467
Surface......	6.116	2.040	4.076	6.70	1.147

Quantités correspondant à un gramme de ferment.

	Sucre disparu.	A. T. formé.	Ac. Fi.
Profondeur...	5.153	5.173	4.840
Surface.......	6.356	5.323	3.554

L'expérience nous montre de plus qu'il reste du sucre réducteur non attaqué, et qu'en conséquence, dans la culture en profondeur, une partie de l'acidité totale provient sûrement d'une autre matière que le glucose.

Les ferments avaient les teneurs en azote suivantes; je les ai comparés à une culture de *mycoderma aceti :*

	Azote 0/0.
n en profondeur..............	4.17
n en surface....................	6.51
Mycoderma aceti..............	4.81

Ces nombres sont comparables entre eux ; mais il est curieux de voir que le ferment en surface est plus riche en azote.

Ces nombres sont de plus inférieurs à ceux trouvés antérieurement, ceci dépend uniquement de la richesse du milieu en azote, nous le verrons bientôt.

Quatrième expérience.

Le milieu de culture est du jus d'oignons avec 22,05 0/00 d'extrait et 7,53 de sucre réducteur ; le ferment ensemencé est le ferment *n*.

	Ac. Fi. 0/00.	S. Disparu 0/00.	Azote du ferment 0/0.
Profondeur.........	4.257	4.47	9.51
Surface.......... ..	1.799	2.83	13.58

Nous constatons à nouveau que le ferment en surface est plus riche en azote.

Le tableau suivant nous montre encore la grande influence qu'a la richesse en peptone du milieu.

Quantités par litre.

	A. Moût primitif.	
	Extrait.	Azote.
	—	—
Jus d'oignons........................	10.40	0.155
Jus d'oignons + 0,92 0/0 peptone.....	19.65	0.850

	B. Moût fermenté. — Ferment *n*.						
	Extrait.	Ac. To.	A. Vo.	A. Fi.	Azote.	Ferment. Poids.	Ferment. Az. 0/0.
	—	—	—	—	—	—	—
Jus d'oignons................	8.20	2.790	0.401	2.389	0.130	0.173	10.72
Jus d'oignons + 0,92 0/0 pept.	16.60	5.832	0.467	5.365	0.720	0.380	12.84

Nous voyons d'abord la confirmation de ce que nous savions, que la peptone agit surtout sur l'acidité fixe, que c'est dans le matras additionné de peptone que l'acidité est la plus élevée; en plus, nous constatons que c'est encore dans le même matras que nous trouvons le poids le plus élevé de ferment; celui-ci est en même temps le plus riche en azote.

La richesse en azote du ferment peut atteindre un chiffre très élevé, de façon à ressembler à de la matière albuminoïde.

Voici un moût de bière avec 8,5 0/00 de maltose; il est ensemencé avec le ferment *m* de la distillerie; la fermentation a duré 14 semaines.

Le moût fermenté dosait 6,41 0/00 de maltose, et une partie de l'acide lactique fourni provenait sans doute de la dextrine attaquée directement ou préalablement transformée par l'acide lactique produit.

L'acidité totale est de 3,68 0/00, l'acidité volatile de 0,339 0/00, l'acidité fixe de 3,341 ; le poids du ferment est de 0,092; donc un gramme de ferment a donné lieu à 36,3 d'acide fixe; ce ferment, très gros au microscope, dosait 15 0/0 d'azote.

Nous avons déjà passé en revue de nombreuses expériences concernant la variation de l'acidité; il restait à voir la variation de la richesse en azote d'un ferment pendant la durée d'une fermentation; le ferment *m* s'y prêtait très-bien, car on peut le retenir entièrement sur le filtre.

Le milieu de culture est du moût de bière préparé au laboratoire avec un mélange de malt, d'avoine et de blé germés, à raison de 1/3 de chaque; j'y ai fait des prises à trois intervalles

déterminés avec des pipettes flambées, à raison de 250 à 300 c. c. chaque fois.

Variation de l'Azote dans un ferment.

	Quantités par litre. — Ferment m.		
	1re prise. Après 3 jours.	2e prise. 12 jours.	3e prise. 45 jours.
Moût primitif (maltose)......	28.52	—	—
Moût fermenté —	22.89	—	21.01
Acidité totale...............	3.674	6.316	7.576
Acidité volatile..............	0.355	0.485	0.606
Acidité fixe..................	3.319	5.731	6.970
Rapport A...................	9.4	11.8	11.5
Poids du ferment...........	0.342	0.303	0.322
Azote 0/0 du ferment..	9.1	10.8	11.83
Azote du moût témoin.......	0.690	—	—
Azote du moût fermenté.....	0.658	—	—

Ce tableau nous montre comment l'acidité va régulièrement en croissant; le rapport A nous indique que l'acide fixe augmente proportionnellement jusque vers le 12e jour. Nous remarquons, en outre, que les poids du ferment, 0gr,342, 0gr,303, 0gr,322 sont sensiblement pareils, pour autant que la prise et l'agitation préalable l'ont permis.

On voit de plus qu'à partir d'un certain moment le ferment cesse de se multiplier; c'est vers le 12e jour que le ferment *m* semble être à son maximum de puissance, c'est alors que le rapport A est maximum; mais, ce qu'il y a de curieux, c'est que la proportion d'azote du ferment va régulièrement en augmentant, et c'est le ferment de 45 jours qui est le plus riche en azote.

En résumé la matière azotée intervient dans la fermentation lactique d'une façon très énergique, non seulement par sa quantité, mais encore par sa qualité.

Cette intervention imprévue de la matière azotée dans la production de l'acide lactique empêche d'attribuer un sens tout à fait précis aux nombres que nous avons trouvés dans le paragraphe précédent pour le rapport entre le sucre disparu et l'acide produit. Il faut d'autant plus se défier de l'exactitude absolue de ce rapport que j'ai vu une addition de 2,5 0/0 de peptone par litre dans de l'eau de touraillons faire monter l'acidité au double de ce qu'elle était avec une addition de 2 grammes de lactose par litre.

De même, il devient très difficile de savoir comment un ferment se comporte avec les diverses substances sucrées, qu'il faut nécessairement introduire dans des milieux de culture très favorables, puisque, en dehors des sucres ordinaires, elles sont assez résistantes aux ferments. Or, dans ce milieu favorable, il est assez difficile de faire la part de ce qui revient au sucre, distraction faite de ce qui revient à la substance azotée.

Enfin, nous allons nous heurter à cette influence de la matière azotée en étudiant la relation entre la constitution et le pouvoir rotatoire du sucre et le pouvoir rotatoire de l'acide formé. Mais avant d'aborder cette partie du travail, il faut d'abord établir quelques notions préliminaires.

ÉTUDE DES SELS. — LACTATES DE ZINC

Liebig a déjà signalé pour les différents lactates de zinc et de calcium les différences en eau de cristallisation ; après lui *Engelhardt* et *Madrelle*, *Wislicenus* et *Heintz* ont trouvé que ces sels se différenciaient par la formation des cristaux, leur eau de cristallisation, leur facilité plus ou moins grande de perdre cette eau, leur solubilité et leur pouvoir rotatoire.

Ces savants ont trouvé que les lactates de zinc inactifs cristallisaient avec $3H^2O$, les lactates actifs avec $2H^2O$; que les lactates de zinc inactifs perdaient vite leur eau de cristallisation, même à 100°, tandis que les lactates actifs mettaient souvent des heures.

J'ai vu, comme *Engelhardt* l'avait déjà signalé, que les lactates inactifs perdent très facilement leur eau de cristallisation, et qu'il y a une grande différence entre le sel gauche et le sel droit. Ce dernier perd bien plus facilement l'eau de cristallisation ; les dernières traces seules s'en vont difficilement. C'est ainsi que le sel droit perd toute son eau par un chauffage d'une demi-heure à 140°, pendant que le sel gauche en a à peine perdu la moitié ; ce fait est en relation avec la plus grande solubilité des sels gauches.

Engelhardt a trouvé que les lactates de zinc gauches sont plus solubles que les lactates inactifs. Pour étudier leur solubilité, j'ai mis ces sels en excès dans 20 à 30 c. c. d'eau distillée ; ces solutions sont abandonnées, en agitant de temps à autre, dans un bain-marie maintenu à 20° à l'aide d'un régulateur Etienne.

Un volume quelconque du liquide clair est pesé dans une capsule tarée, puis évaporé et séché à 30°; voici les résultats obtenus :

1er lactate de zinc inactif.........	1.717 0/0.	T. — 20°
2e — —	1.769 0/0.	
2e lactate porté préalablement à 30°.	2.305	
1er lactate de zinc droit...........	5.242	
2e — —	5.232	
1er lactate de zinc gauche.........	5.439	
2e — —	5.347	
Lactate de chaux inactif...........	4.911	
Lactate de chaux gauche..........	6.643	
Lactate de cadmium inactif.......	11.03	
Lactate de cadmium gauche.......	135.30	

Les sels actifs sont donc plus solubles que les sels inactifs; ce sont les lactates de cadmium qui sont les plus solubles.

L'élévation de la température à 30° a permis d'augmenter la solubilité du lactate de zinc inactif d'environ 0,5 0/0. Dans un mélange de sels gauches et de sels droits, ce sont les sels gauches qui cristallisent les derniers.

Wislicenus, *Klimenko* ont constaté que la dilution du lactate gauche augmentait la rotation. *Schardinger* a fait la même observation pour le lactate droit.

Voici ce que j'ai observé sous ce rapport :

Lactate gauche. Zn. Ferment *b* sucre : glucose.			Lact. gauche. Zn. Ferment *p* sucre : lactose.			Lactate droit. Zn. Ferment *e* sucre : saccharose.		
Concentrat. 0/0.	Rot.	P. R.	Concentr. 0/0.	Rot.	P. R.	Conc. 0/0.	Rot.	P. R.
1.720	16′	7°45	2.220	22′	8°15	1.824	23′	10°30′
3.476	33′	7°54	2.732	27′	8°14	3.988	41′	8°31′
3.796	38′	8°20	5.528	50′	7°30	4.160	40′	7°45

La variabilité réelle de toutes les propriétés pouvant servir à reconnaître un lactate oblige donc à y regarder de très près quand on veut préciser la nature du sel obtenu dans une fermentation, et c'est ce que nous devrons nous rappeler dans le courant de notre recherche.

Les difficultés augmentent encore par suite de ce fait que si la fermentation lactique ordinaire fournit deux acides isomériques de pouvoir rotatoire opposé, l'un identique avec l'acide gauche de *Tate* et de *Schardinger*, l'autre avec l'acide sarcolacti-

que, il n'est pas assuré que le même microbe donne toujours le même acide avec le même sucre.

C'est ainsi que M. *Péré* a trouvé que le *B. coli commune* donne avec la dextrose de l'acide dextrogyre, et avec le lévulose de l'acide inactif par compensation : mais, dès qu'on le place dans des conditions défavorables, on a de l'acide droit; il consomme l'acide gauche comme ceci arrive avec beaucoup d'autres végétaux. Il peut se faire qu'il en soit ainsi avec beaucoup d'autres ferments lactiques; ils peuvent ou ne pas produire les deux acides à la fois, ou en détruire l'un plus facilement que l'autre, suivant les conditions de culture.

Ainsi le bacille de Tate donne de l'acide gauche avec la dextrose et la mannite, de l'acide inactif avec la rhamnose; nous allons voir que beaucoup de mes ferments se sont comportés d'une façon analogue. Voici, en effet, le résumé de mes expériences sur ce sujet. Dans chaque ligne horizontale, on trouvera l'indication du microbe, celle du milieu de culture (lait, eau de touraillons (ET) additionnée de divers sucres, moût de bière), le poids humide, le poids sec, et le nombre de molécules d'eau du sel de zinc obtenu au moyen des acides fixes de la fermentation, les nombres relatifs à son pouvoir rotatoire, et la proportion d'oxyde de zinc qu'il contient. Je rappelle que, d'après *Wislicenus*, le pouvoir rotatoire des lactates de zinc est de sens contraire à celui de l'acide générateur.

Ferment.	Sucre.	Poids humide.	Poids sec.	H^2O.	Rotation.	P. Rot.	ZnO 0/0.
—	—	—	—	—	—	—	—
a	ET. Glucose..........	0.581	0.507	2m.00	21'5*g*	8°30'	—
a	M. Bière..............	0.510	0.441	2. 01	21'*g*	9°45'	—
b	ET. Glucose..........	1.092	0.949	2. 03	38'*g*	8°20'	33.2
b	ET. Galactose.........	1.468	1.274	2. 04	45'*g*	7°21'	33.5
b	Lait peptonisé........	0.582	0.504	2. 08	23'*g*	9°30'	—
c	ET. Glucose..........	0.677	0.589	2. 00	26'*g*	9°11'	32.4
c	M. Bière..............	0.444	0.386	2. 03	16'*g*	8°38'	—
c	Lait peptonisé........	0.514	0.447	2. 00	20'*g*	9°19'	33.1
r	ET. Glucose..........	0.465	0.403	2. 05	21'*g*	10°51'	33.2
r	ET. Saccharose.......	0.465	0.404	2. 00	22'*g*	11°19'	32.6
r	M. Bière..............	0.158	0.137	2. 00	6'*g*	9°7'	—
s	ET. Saccharose.......	—	0.380	3. 00	Inactif	—	—
s	ET. Lactose..........	—	0.382	3. 00	»	—	33.5
s	ET. Glucose..........	—	0.630	3. 00	»	—	—
s	ET. Lévulose.........	—	0.329	3. 00	»	—	—

1. E. T. veut dire eau de touraillons; M. Bière, moût de bière.

Ferment.	Sucre.	Poids humide.	Poids sec.	H^2O.	Rotation.	P. Rot.	ZnO 0/0.
d	ET. Glucose..........	0.168	0.147	2. 00	10′*g*	14°10′	33.0
d	Lait peptonisé........	0.252	0.220	2. 00	13′*g*	12°18′	33.3
d	Moût Bière...........	0.341	0.298	2. 00	14′*g*	9°47′	32.8
e	ET. Saccharose.......	1.145	0.997	2. 01	41′*d*	8°31′	33.3
e	ET. Glucose..........	0.624	0.541	2. 06	22′*d*	8°28′	—
e	Lait peptonisé........	0.162	0.137	2. 44	11′*d*	16°43′	—
g	ET. Glucose..........	0.837	0.729	2. 00	31′*g*	8°52′	33.7
g	ET. Glucose..........	—	0.407	2. 00	18′*g*	9°12′	33.6
g	M. Bière..............	0.344	0.280	3. 08	Inactif	—	34.2
g	Lait peptonisé........	0.261	0.226	2. 06	10′*g*	9°13′	34.0
g	ET. Galactose.........	0.160	0.138	2. 06	7′5*g*	11°23′	32.1
h	ET. Glucose..........	0.465	0.404	2. 01	19′*d*	9°47′	33.3
h	ET. Saccharose.......	0.514	0.445	2. 07	22′*d*	10°18′	—
h	M. Bière..............	0.579	0.502	2. 07	22′*d*	9°7′	33.5
h	Lait peptonisé........	0.207	0.179	3. 08	8′*d*	9°17′	—
l	ET. Glucose..........	0.416	0.361	2. 03	17′*d*	9°48′	33.6
l	Lait peptonisé........	0.431	0.352	3. 03	Inactif	—	33.3
l	Moût de bière........	—	0.269	2. 09	12′*g*	9°17′	—
m	M. Bière..............	0.207	0.168	3. 01	Inactif	—	—
m	Lait peptonisé........	0.211	0.183	2. 04	9′*g*	10°14′	—
m	ET. Saccharose.......	0.835	0.712	2. 02	24′*g*	7°1′	—
m	ET. Glucose..........	0.350	0.297	2. 05	11′*g*	7°43′	34.1
n	ET. Glucose..........	0.198	0.162	3. 00	Inactif	—	34.2
n	ET. Sucre interverti..	0.246	0.213	2. 06	7′*g*	6°50′	—
n	ET. Empois...........	0.275	0.239	2. 00	13′*g*	11°20′	34.1
n	ET. Maltose..........	0.196	0.167	2. 04	7′*g*	8°44′	—
n	M. Bière..............	0.382	0.313	3. 00	Inactif	—	—
n	ET. Lévulose.........	0.767	0.661	2. 01	27′*g*	8°30′	34.0
n	ET. Galactose.........	0.842	0.732	2. 00	23′*g*	7°6′	34.5
n	ET. Lactose..........	0.361	0.315	2. 00	14′*g*	9°15′	—
n	ET. Saccharose.......	0.751	0.645	2. 07	20′*g*	6°27′	33.1
n	ET. Mannite..........	0.316	0.271	2. 07	10′*g*	7°39′	34.0
o	ET. Saccharose.......	0.142	0.116	3. 00	Inactif	—	32.4
o	ET. Glucose..........	0.265	0.227	2. 04	10′*g*	9°11′	34.1
o	M. Bière..............	0.432	0.354	3. 00	Inactif	—	31.8
p	ET. Lactose..........	0.792	0.683	2. 02	27′*g*	8°14′	32.7
p	Lait peptonisé........	0.537	0.469	2. 00	20′*g*	8°53′	—
p	ET. Galactose.........	0.137	0.112	3. 00	Inactif	—	—
p	ET. Saccharose.......	0.256	0.210	3. 00	Inactif	—	32.5
p	M. Bière..............	0.607	0.497	3. 00	Inactif	—	33.4
p	ET. Glucose..........	1.031	0.895	2. 00	39′*g*	9°4′	33.7

On remarquera d'abord que j'ai obtenu des pouvoirs rotatoires variables. Nous savons que la concentration de la liqueur intervient ici; or, pour certains sels, je ne disposais que de faibles quantités; de plus, malgré le grand nombre de lectures faites pour chaque sel, on peut toujours admettre une erreur allant jusqu'à 2 minutes, d'autant plus importante que la rotation était plus faible.

Il est encore probable que j'ai souvent eu affaire à un mélange de deux lactates avec le même microorganisme, dont l'un était représenté par des traces difficiles à éliminer, mais qui ont influencé la rotation ; cette hypothèse est d'autant plus facile à admettre que nous savons que l'acide lactique provient de deux sources : la matière azotée et le sucre.

Les nombres obtenus nous renseignent toujours sur la rotation.

Comparons d'abord les différents ferments dans un même milieu. Nous voyons que dans l'eau de touraillons presque tous nos microbes ont donné des sels gauches, c'est-à-dire des acides droits, excepté *e*, *h*, *l* et *n*; il convient de remarquer que le ferment *n* donne de préférence des sels gauches avec le glucose.

Nous voyons que tantôt nous avons des sels gauches, tantôt des sels droits, tantôt des sels inactifs; il en est de même avec tous les milieux examinés.

C'est ainsi qu'avec le moût de bière, nous avons quatre sels gauches, un sel droit et cinq sels inactifs; les sels inactifs ont été obtenus avec les ferments vigoureux qui ont donné le maximum d'acidité fixe dans nos essais. L'influence du ferment est donc manifeste.

Examinons le même ferment dans différents milieux; nous aurons en même temps une idée de la pureté des sels étudiés.

Nous remarquons que les ferments *a*, *b*, *c* et *r* retirés de la crème n'ont donné que des lactates gauches avec les divers milieux employés; nous voyons également par la teneur en ZnO que la plupart des sels étaient pour ainsi dire tout à fait purs et contenaient environ 33,33 0/0 de ZnO.

Les petits écarts constatés sont dus ou à une faible volatilisation de ZnO, ou encore à une trace d'impuretés (acétates, sulfates).

Le ferment *d* donne des sels gauches, le ferment *e* des sels droits et le ferment *s* des sels inactifs; le ferment *g* n'a fourni que des sels gauches et un sel inactif avec le moût de bière.

Le ferment *h* ne donne que des sels droits; le ferment *l* fournit, suivant le milieu, un sel gauche, droit ou inactif; c'est ce qui avait déjà été constaté par M. Péré ; aussi l'acide fourni ne peut-il servir de caractère de différenciation, comme le croyait Nencki.

Le ferment *m* donne des sels gauches ou inactifs.

Les ferments *o* et *p* retirés d'une bière belge donnent tantôt des sels gauches, tantôt des sels inactifs comme dans le moût de bière et l'eau de touraillons additionnée de saccharose; mais, chose curieuse, on obtient avec le galactose un sel inactif et avec le lactose un sel gauche.

Nous arrivons enfin au ferment *n*, celui qui a servi au plus grand nombre d'expériences; nous remarquons qu'il donne des sels gauches avec tous les sucres, excepté avec le moût de bière; l'eau de touraillons glucosée n'a donné qu'une seule fois un sel inactif et c'était avec le ferment *n*; mais on obtient ordinairement avec ce ferment et le glucose un sel gauche.

Il faut encore signaler que le moût de bière de brasserie a donné un sel inactif, tandis que dans une solution de maltose additionnée de peptone, le sel obtenu tournait à gauche. Est-ce l'action de la peptone qui se fait ici sentir? On serait tenté de le croire, en se rapportant aux expériences que nous allons discuter plus loin.

Il importe encore d'examiner deux autres nombres relatifs aux lactates obtenus avec le sucre interverti et le saccharose pour le ferment *n*; les pouvoirs rotatoires sont bien plus faibles, bien que les poids essayés ne fussent pas très faibles.

Nous savons que la peptone intervient directement dans la formation de l'acidité fixe, que de plus les ferments lactiques sont très friands de peptone; il est dès lors très difficile de faire la part respective de la matière azotée et des sucres plus difficiles à attaquer.

Je crois néanmoins pouvoir affirmer que le ferment *n*, le seul essayé sous ce rapport, jouit de la faculté de donner de l'acide lactique avec les sucres : xylose, mélézitose, tréhalose, arabinose, galactose, raffinose, sucres que je dois à l'extrême obligeance de MM. Bertrand, Fernbach, Lindet et Maquenne; les quantités de sels obtenus avec ces sucres étaient proportionnellement bien plus grandes que celles obtenues avec la peptone seule; il n'y a aucun doute à avoir pour le galactose et l'arabinose.

Je me contenterai de citer l'expérience suivante :

Ferment π.

Eau de Seine + 0.5 0/0 de peptone Chapoteaut + 3 0/o des sucres purs.

	Poids sec.	Rotation.	Pouv. Rot.
Arabinose.........	0.326	10′g	6°23′
Galactose..........	0.558	11′g	4°6′
Galactose..........	0.901	18′g	4°9′
Raffinose..........	0.271	13′g	9°39′
Mannite...........	0.286	12′g	9°1′
Peptone seule......	0.378	10′g	5°30′

Il se peut que lorsque le sucre est difficile à attaquer, le ferment s'attaque de préférence à la matière azotée qui intervient ainsi dans la rotation du sel.

Le tableau suivant nous donnera une récapitulation générale du sens de la rotation des lactates de zinc avec les différents sucres et pour les différents ferments.

SUCRE	MILIEU	a	b	r	c	d	e	s	g	h	l	m	n	o	p
$C^5H^{10}O^5$															
Arabinose	Eau de Seine peptonisée.	»	»	»	»		»	»	»	»	»	»	g	»	»
Xylose...	—	»	»	»	»		»	»	»	»	»	»	g	»	»
$C^6H^{14}O^6$															
Mannite..	E. de touraillons.	»	»	»	»	»	»	»	»	»	»	»	g	»	»
$C^6H^{12}O^6$															
Glucose..	—	g	g	g	g	g	» d	In	g	d	d	g	Ing	g	g
Lévulose.	—	»	»	g	»	»	»	In	»	»	»	»	g	»	»
Galactose	—	»	g	»	»	»	»	»	g	»	»	»	g	»	In
$C^{12}H^{22}O^{11}$															
Maltose..	Moût de bière.	g	»	g	g	g	»	»	In	d	g	In	In	In	In
—	Eau peptonisée.	»	»	»	»	»	»	»	»	»	»	»	g	»	»
Lactose..	Lait peptonisé.	»	g	»	g	g	d	»	g	d	In	g	»	»	g
—	E. de touraillons.	»	»	»	»	»	»	In	»	»	»	g	»	»	g
Saccharose	—	»	»	g	»	»	d	In	»	d	»	g	g	In	In
Melézitose	Eau peptonisée.	»	»	»	»	»	»	»	»	»	»	g	g	»	»
Tréhalose	—	»	»	»	»	»	»	»	»	»	»	»	g	»	»
$C^6H^{10}O^5$															
Amidon..	E. de touraillons.	»	»	»	»	»	»	»	»	»	»	g	g	»	»

Nous voyons qu'il n'existe aucune relation entre le sucre générateur et l'acide produit; tel ferment donne avec tous les sucres des acides droits, tel autre des acides gauches, tel autre des acides inactifs; enfin il y en a qui peuvent donner divers acides suivant le milieu dans lequel ils sont ensemencés.

Il y a des ferments qui donnent de l'acide lactique d'un pouvoir rotatoire opposé avec des sucres possédant le même poids moléculaire, tout à fait comme nous avons trouvé que le même poids de sucre détruit ne donne pas toujours le même poids d'acide lactique, l'acidité volatile variant essentiellement avec le mode de culture, la richesse du milieu et le ferment producteur.

Obtient-on le même acide au début et à la fin d'une même fermentation; ceci semble être le cas d'après l'expérience suivante.

De l'eau de touraillons avec 40,60 0/00 d'extrait et 35,61 0/00 de glucose a été ensemencée avec le ferment *n*; j'ai préparé les sels de zinc avec la prise faite au bout de 10 jours et le restant du liquide analysé après 25 jours : voici les résultats :

	Acidité totale 0/00.	Poids hum.	Poids sec.	Rotat.	P. Rot.
	—	—	—	—	—
Après 10 jours.	4.42	0.430	0.370	15′*g*	8°26′
— 25 —	6.48	1.431	1.254	41′*g*	6°48′

Obtient-on le même acide lactique par la culture en surface et en profondeur?

Eau de touraillons glucosée (traces de peptone), ferment n.

	Poids hum.	Poids sec.	Rotat.	P. Rotat.	Zn 0 0/0.
	—	—	—	—	—
Profondeur...	1.070	0.869	23′*g*	5°30′	33.8
Surface	0.816	0.710	29′*g*	8°21′	33.5

Si nous mettons les pouvoirs rotatoires en rapport avec la proportion d'eau, nous trouvons que, dans la culture en profondeur, cette teneur se rapproche davantage de celle des sels inactifs; aussi est-on tenté d'admettre que, dans la culture en profondeur, on obtient un mélange d'acides actif et inactif, et que c'est le sel inactif qui fait baisser le pouvoir rotatoire.

Il reste un dernier point à examiner. Nous avons parlé à diverses reprises, dans le courant de ce travail, de combustions aérobies. Ont-elles porté sur le sucre, ou le ferment lactique est-

il capable, comme le ferment acétique, de brûler l'acide qu'il a formé? Dans ce cas, tient-il compte, comme d'autres microbes, du pouvoir rotatoire, et, dans l'acide lactique inactif, brûle-t-il de préférence un des constituants.

Un premier essai que j'ai fait avec une solution de lactate de chaux du commerce, à raison de 2 0/0 et additionné de traces de bouillon Liebig, n'a donné que des résultats négatifs.

Il en était encore de même d'un 2e essai avec du lait peptonisé et débarrassé du sucre de lait par une levure de lactose.

Enfin, dans un troisième essai, l'attaque, quoique très faible, semble être très nette.

Je dissous dans 400 c. c. cinq grammes de lactate de chaux inactif, obtenu par la culture du ferment *n vieux* dans le moût de bière; j'ajoute 2 grammes de peptone Chapoteaut, et ce liquide est partagé en quatre parts que j'ensemence avec les ferments *n vieux*, c'est-à-dire conservé 6 mois dans du jus d'oignons sans craie, *n rajeuni*, *b* et *h*.

Voici les changements observés déjà au bout de quelques jours :

n vieux...	Liquide reste jaune citron.
b —	— —
n jeune...	Liquide devient brunâtre.
h —	— —

Au bout de 5 semaines, je ramène tous les liquides au volume initial, excepté le liquide *h* qui est ramené au double.

L'examen microscopique montre que les deux ferments *h* et *n rajeuni* se sont bien développés, la réaction est alcaline.

Ces liquides étant trop foncés, je suis obligé de les décolorer par du noir animal pour faire l'observation polarimétrique.

Voici la rotation observée dans le tube de 20 c. c.

n vieux...		à gauche 30 minutes.
b —		— 24 —
h —	Inactif ou	à droite 4 —.
n rajeuni...		à gauche 4 —

Il faut en conclure que le lactate inactif a été attaqué par les ferments *h* et *n jeune*.

Dans ces deux matras, il existait au fond un dépôt très-collant;

une trace, examinée au microscope, a montré des ferments lactiques et une matière inerte ne ressemblant nullement au lactate de chaux primitif et faisant effervescence avec de l'acide chlorhydrique dilué ; c'était du carbonate de chaux.

Je dissous les deux résidus par de l'acide chlorhydrique dilué, je chasse l'acide, je reprends par un peu d'eau et je précipite la chaux à l'état d'oxalate ; je dois ajouter que j'avais perdu un peu de résidu par la première filtration des liquides.

Je trouve ainsi pour *n* rajeuni		0.037 CO^3Ca.
h		0.029 —
Ce qui correspond pour *n*	à...	0.081 $(C^3H^5O^3)^2Ca$.
h		0.063 —

La combustion n'est donc pas douteuse.

EXISTE-T-IL UNE DIASTASE LACTIQUE ?

Tout ce que nous venons de voir nous montre que le phénomène de la fermentation lactique est loin d'avoir la simplicité qui correspond à l'équation classique :

$$C^6H^{12}O^6 = 2\,C^3H^6O^3$$

Mais comme cette équation correspond à un dédoublement, divers savants, tels que *Hoppe-Seyler* en 1859, *Billroth* en 1877, se sont demandé s'il n'y avait pas là une simple action de diastase, analogue à celle qui dédouble le saccharose. Rien ne dit, *a priori*, que ce soit impossible. Le dédoublement d'une molécule de sucre en deux d'acide lactique dégage de la chaleur, et si la fermentation lactique ne le réalise pas, rien ne dit qu'elle ne soit la superposition d'un dédoublement diastasique et d'une action de ferment sur les produits formés.

Ce que nous venons de voir au sujet de la difficulté de la combustion des lactates par les ferments lactiques n'est pas favorable à cette manière de voir. Mais il vaut mieux consulter à ce sujet l'expérience.

Celles que j'ai faites pour montrer l'existence d'une diastase m'ont toutes donné des résultats négatifs.

Première expérience. — Du moût de bière est ensemencé avec

plusieurs ferments lactiques; la fermentation dure un mois; je fais passer le liquide fermenté à travers une bougie Chamberland dans un vase stérile, 20 c. c. de ce liquide sont ajoutés à 50 c. c. d'une solution stérile de maltose neutre et à 50 c. c. de la même solution acide; d'autre part le résidu microbien est broyé, dans un mortier stérilisé, avec de l'eau; je fais également passer ce liquide à travers la bougie Chamberland, et agir aux mêmes doses sur les mêmes solutions de maltose stériles.

Après 15 jours de macération à la température de 28°, je ne constate nulle part la moindre augmentation dans l'acidité.

Deuxième expérience. — Une solution de lactose avec des traces de peptone et de lait peptonisé est ensemencée avec les ferments *c*, *e*, *m*, *n* et *p*.

Après 8 jours de fermentation je filtre le liquide à travers une bougie Chamberland et je recueille environ 50 c. c. dans des vases coniques flambés.

Je pèse les matras et je dose l'acidité des différents liquides.

Pour chaque ferment j'ai quatre vases coniques; deux sont abandonnés à eux-mêmes après la pesée; les deux autres sont pesés et portés pendant une demi-heure à 100°, puis placés à l'étuve à côté des deux premiers.

Au bout de 15 jours, je dose l'acidité à l'aide de la même eau de chaux et du même papier de tournesol.

Les liquides sont d'abord ramenés au poids primitif, bien agités et titrés; l'observation microscopique n'a révélé la présence d'aucun bacille, les liquides étaient restés tout à fait clairs, et on n'a constaté aucune différence d'acidité entre les matras chauffés et non chauffés. La dose d'acide aurait dû augmenter dans ces derniers, si les 8 jours de culture y avaient déposé une diastase lactique.

A ces essais on peut faire deux objections : la première, c'est que la diastase lactique a pu être arrêtée par la bougie; la seconde, c'est qu'elle a pu être retenue dans les tissus du microbe.

Nous savons que les tissus microbiens mis en macération avec de l'eau distillée cèdent parfois facilement leurs diastases, telle la sucrase. Aussi fallait-il faire une expérience dans ce sens.

Troisième expérience. — Je laisse fermenter pendant deux mois du moût de bière avec les ferments *b*, *n* et *o*: le moût était contenu dans de grands ballons Pasteur à deux tubulures.

Je remplace alors le moût par de l'eau distillée stérile, en présence d'un peu d'essence de moutarde.

Je laisse macérer pendant 10 jours, je décante le liquide dans des vases flambés, et, à l'aide de pipettes flambées, je prélève un certain volume de ce liquide que je fais agir sur une solution stérile de lactose à 2 0/00, contenue dans des vases coniques.

Tous les matras sont pesés avant et après l'addition du liquide diastasifère; ils sont ramenés au même poids à la fin de l'expérience, c'est-à-dire au bout de dix jours.

Tous les matras étaient en double ; ils ont été divisés en trois groupes :

1er *groupe.* — 50 c. c. de solution de lactose, plus 10 c. c. de liquide diastasifère.

2e *groupe.* — 50 c. c. du mélange des deux liquides et passés à la bougie Chamberland.

3e *groupe.* — 50 c. c. de la solution de lactose, plus 10 c. c. du liquide diastasifère, portés à 60° pendant une demi-heure.

Dans aucun ballon, je n'observe une augmentation d'acidité.

Quatrième expérience. — Les ferments *m* et *n* ont été traités comme dans l'expérience III, le moût de bière est remplacé par du jus d'oignons ; je ne constate aucune augmentation de l'acidité originaire.

Il semble donc qu'on peut conclure à l'absence d'une diastase lactique.

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS

Dans la *première* partie de ce travail, j'ai montré l'origine des ferments lactiques, leur morphologie, leurs fonctions physiologiques, leurs caractères distinctifs dans divers milieux.

J'ai indiqué les méthodes de culture employées.

Je dois surtout signaler ici les différences constatées dans leur résistance à la chaleur en milieu liquide, le temps qu'il leur faut pour cailler le même lait à diverses températures, l'acidité produite dans divers milieux, leur résistance à la dessiccation.

Dans la *deuxième* partie j'ai étudié :

A. — *La réaction du milieu.*

J'ai montré :

1° Que l'acidité totale, fixe et volatile, dépendaient du microbe ensemencé ;

2° Que l'acidité était beaucoup plus élevée en milieu neutre ;

3° Que pour un même microbe l'acidité dépendait essentiellement du milieu et du mode de culture.

B. — *Influence de la durée de la fermentation.*

1° L'acidité totale augmente continuellement chez certains ferments ; chez d'autres elle décroît à un moment donné pour ensuite augmenter ou osciller autour d'une certaine limite ;

2° L'acidité volatile varie dans le même sens ; elle est surtout formée d'acide acétique ;

3° Chez certains ferments l'acidité totale augmente, mais l'acidité fixe diminue continuellement, et il ne reste finalement que de l'acide acétique ;

4° A partir d'un certain jour, variable avec le ferment et le milieu de culture, la quantité totale d'acide produite par jour décroît régulièrement.

C. — *Influence de l'âge.*

1° L'âge du ferment a une grande influence sur la marche de la fermentation ;

2° Les ferments ensemencés en milieux neutres conservent longtemps leurs premières propriétés ; mais ils dégénèrent par culture sur milieux solides ou en milieux acides ;

3° Les ferments d'un mois sont plus vigoureux que les ferments tout jeunes ; à partir de ce moment ils perdent plus ou moins rapidement leur virulence, suivant le milieu dans lequel on les ensemence ; c'est ainsi qu'ils dégénèrent plus vite dans le jus d'oignons sans craie que dans l'eau de navets sans craie.

D. — *Influence de l'air.*

Il y a des ferments lactiques aérobies, anaérobies et des ferments indifférents.

E. — *Influence de la culture en surface et en profondeur.*

1° La culture en surface donne surtout lieu à de l'acide volatil (acide acétique) ;

2° L'acidité fixe peut être très élevée dans les cultures en profondeur et atteindre 85, 90, 95 0/0 du sucre disparu, tandis qu'elle est, en général, beaucoup plus faible dans la culture en surface ;

3° Le ferment mis en jeu joue dans ces différents modes de culture un très grand rôle.

F. — *Influence de la matière azotée.*

1° Les ferments lactiques préfèrent la peptone à toutes les autres matières azotées;

2° L'acidité fixe augmente proportionnellement, jusqu'à une certaine limite, avec la richesse du milieu en peptone; les différences sont d'autant plus sensibles que le ferment est plus exigeant ;

3° L'acidité volatile ne dépend que peu de la richesse du milieu en matière azotée ;

4° Les ferments lactiques donnent de l'acide lactique avec de la matière azotée pure ;

5° Le rapport entre la quantité en poids du ferment et la quantité de sucre disparu peut être très élevé ;

6° Le même poids de ferment transforme en acide fixe plus de sucre par la culture en profondeur que par la culture en surface ;

7° Les ferments lactiques peuvent atteindre une forte teneur en azote, de façon à ressembler à de la matière albuminoïde pure (15 0/0 d'azote) ;

8° La richesse en azote des ferments lactiques est proportionnelle à la richesse en azote du milieu ;

9° Le ferment cultivé en profondeur est moins riche en azote que s'il est cultivé en surface, toutes choses égales d'ailleurs ;

10° Le ferment cesse de se multiplier à partir d'un certain moment; sa richesse en azote augmente avec la durée de la fermentation.

G. — *Influence de la richesse saccharine.*

1° L'addition de sucre à un milieu de culture agit moins activement que l'addition de peptone;

2° Chaque ferment semble préférer certains sucres à d'autres.

H. — *Sels.*

3° Un même ferment peut donner divers acides avec un même sucre;

4° Il y a des ferments qui donnent avec différents sucres le même acide (gauche, droit ou inactif);

5° Un même ferment peut donner lieu à divers acides lactiques;

6° Les sucres en C^6 semblent attaquables par des ferments lactiques vigoureux;

7° L'âge de la semence et les cultures successives dans différents milieux peuvent avoir une influence sur l'acide produit;

8° Le même ferment donne le même acide, qu'il soit cultivé en surface ou en profondeur;

9° Il y a des ferments lactiques qui paraissent attaquer le lactate de chaux inactif.

I. — *Diastase.*

Il ne semble pas exister de diastase lactique.

En résumé, la fermentation lactique est influencée par un grand nombre de facteurs et est sujette à des variations multiples.

Les cellules semblent passer par un maximum d'activité, dépendant du ferment considéré et des conditions alimentaires; aussi est-il très difficile d'établir l'équation exacte de cette fermentation; tout au plus la superposition de diverses équations en rapport avec le moment de la fermentation pourrait-elle permettre de nous faire une idée approchée du phénomène.

BIBLIOGRAPHIE

Baginsky (A). Zur biologie der normalen Milchkothbacterien. — *Zeitschrift fur phys. Chemie*, Bd. XII, p. 443-462.

Berthelot, *Ann. de chimie et de physique*, 3e série IL., p. 322.

Berzélius, Uber die Milchsaüre. — *Ann. der phys. und chemie* XIX, 1830, p. 26.

Beyerinck, *Bot. Zeitung*, 1891, n° 46

Beyerinck, *Centralblatt fur Bacteriologie und Parasitenkunde*, 1889, v. II, p. 44.

Bourquelot (Em.) Les microbes de la fermentation lactique du lait. — *Journ. de pharmacie et de chimie*, 1886, XIII, p. 195.

Boutron et Frémy, Recherches sur la fermentation lactique. — *Ann. de chimie et de phys.*, II, 1840, p. 271.

Boutroux, Sur la fermentation lactique. — *C. R* LXXXVI, p. 605, 1878.

Braconnot, Sur un acide particulier qui se développe dans les matières acescentes. — *Ann. de chimie*, LXXXVI, 1813, p. 84.

Delacroix (E.), Fabrication von Milchsaüre aus dem Milchserum. — *Journ. f. pharm. und chemie*, 5, t. XXIII, 1891, p. 287.

Duclaux (E.), *Annales de chimie et de physique*, 6e série, t. VIII, 542.

Duclaux (E.), Recherches sur les vins. — *Ann. de chimie et de physique*, 5e série, t. III, 1874.

Fernbach (A.), Etude sur la sucrase. — *Thèse de la Faculté des sciences de Paris*, 1890.

Fokker (A. P.), Uber bacterienvernichtende Eigenschaften der Milch. — *Zeitschrift fur Hygiene*, Bd. IX, 1890, p. 41.

Fokker (A. P.), Onderzoekingen omtrent Melkzuurgisting. — *Ned Tydschr. v. Geneesk*, 1890, p. 88.

Fokker (A. P.), Uber das Milchsaüreferment. — (*Centralblatt fur Bacteriologie und Parasitenkunde*, VI, Band., p. 472, 1889.

Percy Frankland and J. **Mac Gregor**, Sarcolactic acid obtained by the fermentation of. inactive lactic acide. — *Trans. of the chem. society*, 1893.

Grimbert, Fermentation par le bacille orthobutylicus. — (*Thèse de la Faculté des sciences de Paris*, 1893.)

Grotenfelt (G.), Studien über die Virulenz einiger Milchsaürebacterien. — *Fortschritte der medecin.*, LL., 1889.

Hayduck, Uber Milchsäuregährung. *Wochenschrift fur Brauerei*, n° 17, Berlin, 1887.

Hueppe (F.), Untersuchungen über die Zersetzung der Milch durch Microorganismen. — *Mittheilungen aus dem Kaiserl. Reichsgesundheitsamte*, II, 1884, p. 309.

Jacquemin (G.), Fabrication industrielle de l'acide lactique. — *Bull. soc. chim., Paris*, t. V, 1891.

Kabrhel (G.), Uber das Ferment der Milchsauregährung in der Milch. — *Allgemeine Wiener med. Zeitung*, n°s 52 et 53, 1889.

Liebig (J.), Uber die Ursachen des raschen Gerinnens der Milch bei Gewitter und die Mittel dasselbe zu verhindern. — *Dissertation Heidelberg*, 1891.

Lindner (P.), Uber ein neues, in Malzmaische vorkommendes Milchsaüre bildendes Ferment. *Wochenschrift fur Brauerei*, n° 23, 1887.

Linossier (G.), Sur le dédoublement de l'acide lactique inactif par les moisissures. — *Bull. soc. chim. Paris*, t. V, p. 10.

Lister, On the lactic fermentation and its bearing on pathology. — *Trans. of the pathological society of London*, vol. 29, 1878.

Lubolt, *Journal fur prakt. Chemie.*, t. LXXVII, p. 282.

Maly, Über die Entstehung der Fleischmilchsäure durch Gährung. — *Berichte der chem. Gesellschaft*, VII, 1874-1568.

Maly, Untersuchungen über die Quelle der Magensaftsäure. — *Liebigs Ann. der Chemie*, V, 173, 1874, p. 227.

Mayer Herm. Über das Milchsäureferment und sein Verhalten gegen Antiseptica. — *Dorpat*, 1888.

Mayer (A.), Studien über die Milchsäuregährung. — *Zeitschrift fur Spiritusindustrie*, 1891, nos 25 à 27.

Nencki (M.), Die isomeren Milchsäuren als Erkennungsmittel einiger Spaltpilzarten. — *Centralblatt fur Bacteriologie und Parasitenkunde*, IX B., 1891.

Nencki et Sieber, Uber die Bildung der Paramilchsäure durch Gährung des Zuckers. — *Sitzungsberichte der kaiserl. Academie der Wissenschaften in Wien*, mai 1889, Bd., XCVIII.

Oppenheimer, Biologie der Milchkothbacterien des Säuglings. — *Cf. Bact.*, p. 586, vol. II, 1889.

Pasteur, Mémoire sur la fermentation appelée lactique. — *Ann. de chimie et de physique*, 3e série, t. LII, p. 404.

Pélouze et Gélis, Fermentation lactique. — *Ann. de chimie et de physique*, 3e série, t. X, 1844.

Péré, Contribution à la biologie du bact. coli commune et du bacille typhique. — *Ann. Inst. Pasteur*, 1892, p. 512.

Péré, Formation des acides lactiques isomériques. — *Ann. Inst. Pasteur*, 25 nov. 1893, p. 737.

Pirotta (R.) et Riboni (G.), Studii sul latte *Milano*, 1879.

Purdie (R.) et Walker (W.), Resolution of lactic acid into its opticaly active compounts. — *Journal of the chem. society*, 16 juin 1892, n° 59.

Remak, *Canstadts Jahresbericht*, t. I, p. 7, 1841.

Richet (Ch.), De la fermentation lactique du sucre de lait. — *C. R*, LXXXVI, 1878, p. 550.

De quelques conditions de la fermentation lactique. — *C. R.*, LXXXVIII, 1879, p. 750.

De l'action de quelques sels métalliques sur la fermentation lactique. — *C. R.*, t. CXIV, 1892, p. 1494.

Schardinger, Uber ein neue, optisch active, Modification der Milchsäure durch bacterielle Spaltung des Rohrzuckers erhalten. — *Monatshefte fur Chemie, Bd.* XI, 1890, p. 545.

Scheele, *Sämmtliche Werke*, t. II, p. 249, 1793.

Scholl (H.), Uber Milchsauregährung. — *Fortschritte der Medicin*, n° 2, 1890.

Storch (V.), Nogle Undersgelser over Flodens Syrning. — *Kjöbenhavn Trykt hos Nielsen and Lydiche*, 1893.

Tate (G.), Uber Gährungsversuche mit einem Linksmilchsäure producirenden ferment. — *Journ. of. the chem. society*, 1893, p. 1263.

Timpe (H.), *Landwirthschaftliche Versuchsstationen*, Bd. XLIII, p. 223.

Weigmann, Sur Säurung des Rahmes mittels Bacterienreinculturen. — *Land. Woch. fur Schlesvig-Holstein*, n° 29, 1890.

Neue Mittheilungen über Rahmsäuerung mittels Reinculturen von Saürebacterien. — *Milchzeitung*, Bd. XIX, p. 944-1890.

Erfahrungen über die Rahmsaüerung mit Reinculturen. — *Land. Woch. fur Schlesvig-Holstein*, n° 16, 1892.

Wislicenus, Die isomeren Milchsäuren. — *Annalen der Chemie und Pharmacie*, neue Reihe, Bd. XCI, 1873, p. 302, et Bd. CLXVI, 1873, p. 6.

ACTION DE CERTAINES SUBSTANCES ANTISEPTIQUES SUR LA LEVURE

PAR M. HAROLD H. MANN

(Travail du laboratoire de chimie biologique à l'Institut Pasteur.)

Parmi les notions complexes que soulève l'étude des antiseptiques, une des moins connues jusqu'ici est celle sur laquelle M. Duclaux a appelé l'attention, celle du rapport qui doit exister entre la quantité de la substance antiseptique et celle du nombre des cellules vivantes exposées à subir son action. Le chloroforme, par exemple, arrête une fermentation où n'interviennent, pour une raison quelconque, qu'un petit nombre de cellules de levure ; il est sans action sensible sur une fermentation bien en train, et, à la condition de mettre assez de levure, on peut faire fermenter de l'eau sucrée reposant sur une couche de chloroforme.

Tous les antiseptiques se comportent-ils de la même façon ? Dans quelle mesure le pouvoir antiseptique d'une substance dépend-il du nombre de cellules sur lesquelles il peut agir ? Peut-on augmenter indéfiniment le nombre de ces cellules sans augmenter en même temps la quantité d'antiseptique, ou bien le degré de concentration de l'antiseptique doit-il marcher de pair avec le degré d'agglomération des cellules vivantes, avec la densité de la population ? Telles sont quelques-unes des questions que je me suis proposé d'examiner, sur le conseil de M. Duclaux, en prenant la levure de bière comme sujet d'expérience. Je n'ai étudié aussi que quelques antiseptiques, et je déclare tout de suite que les conclusions de mon travail ne s'appliquent qu'à l'être vivant et aux substances mises en œuvre. La levure dont je me suis servi était tantôt une culture pure de *saccharomyces cerevisiæ*, tantôt de la levure du commerce, lorsqu'il en fallait de grandes quantités.

L'important est le choix d'une méthode. Il y en a plusieurs

qui viennent à l'esprit et qui ont toutes leurs avantages et leurs inconvénients. Celle dont je me suis servi tout d'abord consiste à mettre dans une quantité connue de liquide nutritif une dose d'antiseptique, suffisante pour gêner, sans l'arrêter, le développement de la levure. On sème dans ce milieu de composition constante des cellules en nombre différent, qu'on laisse se multiplier pendant le même temps dans les mêmes conditions. Si l'effet de l'antiseptique est indépendant du nombre des cellules, elles auront été toutes également retardées, et, après développement, leurs nombres resteront proportionnels à ce qu'ils étaient avant. Si au contraire l'action antiseptique augmente à mesure que diminue le nombre de cellules, comme le serait l'effet d'un poison qu'un plus petit nombre d'êtres vivants auraient à se partager, le développement sera plus lent dans les matras les moins chargés de globules, et les nombres proportionnels seront plus grands après culture, quand on passera des matras originairement pauvres aux matras originairement riches.

Tout revient donc à une numération de cellules qu'on peut faire soit par les compte-globules ordinaires, soit par la méthode des colonies sur gélatine. Une condition importante que nous avons laissée en apparence de côté, dans le raisonnement, intervient pour décider du choix. Il faut, pour que la méthode soit bonne, que le nombre des cellules présentes dans le matras le plus chargé ne soit pas tel qu'elles se gênent les unes les autres, et qu'elles ne soient pas, pour ainsi dire, les unes pour les autres, un antiseptique nouveau dont les effets se superposent à l'effet à étudier; c'est à une expérience à blanc à indiquer ces chiffres maxima, qui varieront du reste suivant qu'on fera plus ou moins varier le temps laissé à la multiplication. Or, quand on fait cette expérience, on voit que le nombre des cellules à introduire dans chaque essai, pour qu'elles ne se gênent pas après multiplication, est tellement faible qu'elles échappent au début à toute numération précise par le compte-globules : il faut avoir recours à la méthode des cultures.

Je me servais d'une gelée formée de 200 grammes de gélatine, 40 grammes de touraillons, bouillis dans un litre d'eau et filtrés, et de 100 grammes de sucre interverti par un peu d'acide qu'on neutralisait ensuite. On faisait avec tout cela un volume de 2 litres. Les cellules de levure poussent bien à la surface et dans les profon-

deurs de cette gelée, et on peut compter avec sécurité des nombres de cellules cent fois plus petits qu'avec la méthode précédente.

Voici les résultats de quelques expériences à blanc, c'est-à-dire sans addition d'antiseptique. La colonne A donne les nombres proportionnels de cellules de levure introduite au début. Ces nombres n'ont pas été déterminés en unités dans les deux premiers essais, ils étaient de 13, 26 et 104 dans le troisième essai. Partout ils ont été très faibles.

La colonne B donne, en heures, le temps laissé à la culture. La colonne C donne le nombre de colonies, égal au nombre de cellules après culture. La colonne D indique ce qu'il aurait dû être dans le cas où chacun des globules aurait poussé librement, sans être gêné par ses voisins.

	A	B	C	D
I	1	3 h. 30	14	12
	2	»	24	24
	4	»	48	48
II	1	6 h. »	19	19
	2	»	44	38
	3	»	56	57
III	1 (13)	17 h. 30	23.5	21.5
	2 (26)	»	46.5	43
	8 (104)	»	171.5	172

On voit que les nombres, après culture, sont exactement dans le même rapport qu'avant. La méthode, dans ces limites, peut donc servir à apprécier les effets d'un antiseptique, et nous allons nous en servir tout à l'heure.

Je veux auparavant en signaler une autre qui revient au même, mais par une voie en apparence tout autre. Imaginons que nous introduisions des nombres différents de cellules dans des quantités égales d'une solution antiseptique dont la force est insuffisante à les tuer toutes ; y aura-t-il la même quantité de cellules détruites lorsqu'on en ajoutera peu que lorsqu'on en ajoutera beaucoup ? Cela revient encore à viser le partage du poison entre les globules présents. Quelques-uns le prendront-ils tout, ou se partage-t-il entre tous ? Dans le premier cas, les chiffres proportionnels, après l'action de l'antiseptique, seront supérieurs à ce qu'ils étaient à l'origine, puisque dans les matras

les moins chargés, la dépopulation par l'antiseptique aura été proportionnellement plus considérable que dans les autres. Dans le second, il n'y aura qu'un retard général, mais les nombres resteront proportionnels. En faisant varier le temps du contact avec le milieu antiseptique, on peut voir si la durée d'action change quelque chose aux premiers résultats.

Les cellules sortant du milieu antiseptique étaient lavées dans un liquide nutritif avant d'être ensemencés dans la gélatine.

ACIDE PHÉNIQUE

Étudié par les deux méthodes qui précèdent, l'acide phénique ne témoigne d'aucune influence du nombre de globules présents sur la puissance d'action de l'antiseptique. Voici en effet 4 expériences faites par la première méthode, résumées dans un tableau de même construction que celui qui précède, et on voit que la multiplication s'est faite à peu près suivant les mêmes lois que s'il n'y avait pas eu d'antiseptique.

A	B	C	D	Ac. phén. 0/0
1	2 h.	32	32	0,013
2	»	62	64	»
4	»	128	128	»
1 (2315)	3 h. 30'	15	17,2	0,053
2 (4630)	»	36	34,5	»
4 (9260)	»	69	69	»
1 (192)	16 h. 30'	22	19,5	0,050
2 (384)	»	39	39	»
1 (532)	17 h. 30'	18,5	23,4	0,039
2 (1064)	»	43,5	46,7	»
4 (2128)	»	93,5	93,5	»

L'action de l'acide phénique sur les globules de levure ne semble donc pas être une action *individuelle*, je veux dire une action portant sur l'individu : c'est une action de milieu, que l'antiseptique rend plus ou moins favorable à la vie des cellules et dont celles-ci éprouvent de la même façon l'influence. C'est ce qui résulte encore du tableau suivant, qui donne les nombres trouvés dans deux expériences faites par la seconde méthode. En présence d'une même dose assez forte d'antiseptique, 0,055 0/0

d'acide phénique, on avait mis des quantités de cellules représentées par les nombres des colonnes 2 et 3. Au bout de temps divers, on comptait, par la méthode des colonies, les nombres de cellules restant. On voit que le rapport de ces nombres demeure à peu près constant, et égal à ce qu'il était à l'origine.

1	2	3	4
Temps d'action.	N. de cellules (a).	N. de cellules (b).	Rapport $\frac{a}{b}$
3 min.	97	230	2,4
10 min.	86	220	2,56
15 min.	74	182	2,46
6 min.	208	450	2,16
11 min.	198	426	2,15

Le nombre des cellules qui dans chacun des essais périssent ou deviennent incapables de se développer, reste donc à peu près proportionnel au nombre de cellules vivantes. L'action apparaît donc comme une action générale, indépendante de toute sélection.

SULFATE DE CUIVRE

Après le phénol, j'ai étudié les sels de métaux lourds possédant des propriétés antiseptiques. Voyons d'abord ce qui est relatif au sulfate de cuivre.

Le tableau suivant donne les résultats de quelques expériences faites avec ce sel, en employant la première méthode. La colonne A donne comme tout à l'heure les nombres proportionnels, et entre parenthèses, les nombres unitaires de globules mis en œuvre; la colonne B le temps de l'action; la colonne C le nombre de cellules trouvées dans chacun des matras additionnés des quantités indiquées de $CuSO^4, 5H^2O$. On a mis entre parenthèses le nombre de cellules du témoin, c'est-à-dire du matras ayant reçu à l'origine la même quantité de globules que le matras le moins chargé de la série, mais sans addition d'antiseptique. Enfin la colonne D donne les nombres proportionnels après culture, en prenant comme unité le nombre des cellules dans le matras qui en a le moins.

	A	B	C	D	Cu SO⁴ 0/0
	—	—	—	—	—
I	1	18 h. 30'.	8 (T. 13)	1	0,01
	2	»	16	2	»
	4	»	41	5,1	»
II	1 (362)	18 h.	178,5 (T. 230)	1	0,05
	2 (724)	»	438,5	2,46	»
	4 (1448)	»	801,5	4,52	»
III	1 (203)	18 h. 30'	260 (T. 405)	1	0,016
	2 (406)	»	569	2,19	»
	4 (812)	»	1160,5	4,46	»
IV	1 (35)	21 h. 45'	355 (T. 586)	1	0,016
	2 (70)	»	761	2,14	»
	4 (140)	»	1344	3,8	»
V	1 (35)	21 h.	237 (T. 330)	1	0,013
	2 (70)	»	565,5	2,38	»
	4 (140)	»	1265,5	5,33	»

On voit que partout, sauf dans un matras de la quatrième expérience, les nombres proportionnels croissent plus vite après qu'avant culture en présence de l'antiseptique, ce qui témoigne, comme nous l'avons vu, que l'action d'une même proportion d'antiseptique est plus puissante lorsque le nombre des cellules est moins grand. On retrouve le même effet dans l'expérience suivante faite par la seconde méthode, et résumée comme nous l'avons fait pour l'acide phénique. La solution contenait environ 0,2 0/0 de sulfate de cuivre cristallisé.

1	2	3	4
Temps d'action.	N. de cellules (a).	N. de cellules (b).	Rapport $\frac{a}{b}$
—	—	—	—
10" et 10'45"	425	935,5	2,2
20'15" et 20'	381,5	886,5	2,32
30'30" et 31'15"	264	487,5	2,41

L'augmentation avec le temps du rapport $\frac{a}{b}$ témoigne qu'il y a plus de cellules rendues inactives, proportionnellement, là où il y en a eu le moins d'ajoutées. Lorsque la quantité de levure augmente, l'effet d'une même solution de sulfate de cuivre est donc *moindre* qu'avec une quantité plus faible. De quoi cet effet dépend-il ? L'hypothèse la plus simple est évidemment que les cellules se teignent ou s'imprègnent de sulfate de cuivre à la façon des laines dans un bain colorant, de sorte qu'il y en a d'autant

plus pour chacune qu'elles sont moins nombreuses. Et cette hypothèse est accessible à l'expérience.

Pour savoir ce qu'il en était, de la levure commerciale a été mélangée avec une solution de sulfate de cuivre, filtrée et lavée jusqu'à disparition du cuivre dans les eaux de lavage. En calcinant la levure restante, on a toujours trouvé du cuivre dans le résidu. Il y a donc fixation de cuivre, mais quelles en sont les conditions? La quantité fixée varie-t-elle avec le temps du contact, avec la dilution de l'antiseptique, avec l'état de la levure? La fixation est-elle due uniquement au contenu soluble ou aux produits de la cellule, ou se fait-elle aussi sur son enveloppe?

Pour résoudre ces questions, il a fallu renoncer aux méthodes bactériologiques et recourir à l'analyse chimique. On faisait agir directement le sulfate de cuivre sur une quantité connue de levure du commerce en suspension dans l'eau; puis on filtrait. Une portion mesurée du liquide filtré servait à déterminer le cuivre. Connaissant ce qu'il y avait originairement de ce métal, on pouvait calculer ce qu'en contenait le liquide entier, et ce qu'il en restait pour la levure.

En chauffant la levure avec de l'eau à 100°, on la tue, on coagule son protoplasme, et on provoque l'exsudation du contenu soluble de la cellule. J'ai cherché tout d'abord les quantités de cuivre fixées comparativement par la levure ordinaire et la levure bouillie, dans des temps différents. Le cuivre était déterminé par précipitation avec le zinc, et, dans les expériences suivantes, la quantité de levure correspondante à la quantité de cuivre donnée comme fixée était de 0gr,95 à 1 gramme, calculée à l'état sec. Le liquide contenait environ 1,43 0/0 de sulfate de cuivre cristallisé.

Temps de l'action.	Levure ordinaire.	Cuivre fixé.	Levure bouillie.	Cuivre fixé
A l'origine	0,188 gr. Cu	»	0,183 gr. Cu	»
15 minutes	0,179	0,009	—	—
1 heure	0,178	0,010	0,174	0,009
4 heures	0,1775	0,0105	0,1745	0,0085

La levure fixe donc environ 1 0/0 de son poids de cuivre. En réponse à la question si *tout* ce cuivre est fixé par les produits solubles, l'expérience répond non. En lavant la levure à l'eau bouillante jusqu'à ce que les eaux de lavage ne donnent plus la

réaction des phosphates (qui comptent probablement parmi les produits solubles les plus adhérents à la cellule) en traitant le résidu par le sulfate de cuivre, filtrant à nouveau, et lavant jusqu'à disparition de ce métal dans les eaux de lavage, on a toujours trouvé du cuivre en quantités appréciables dans le résidu resté sur filtre. Évidemment les matériaux insolubles de la cellule prennent part à la fixation du cuivre observée dans ces expériences.

Mais la plus grande partie de l'effet est due aux matériaux solubles, et il était intéressant de savoir à quel état le cuivre était retenu par eux. Une portion du précipité produit dans l'eau de levure a donc été lavée jusqu'à disparition du cuivre soluble : en traitant le résidu par l'acide azotique dilué, on en a dissous une partie contenant tout le cuivre, et il en est resté une masse gélatineuse débarrassée de ce métal. En analysant dans deux portions égales du liquide filtré le cuivre et l'acide phosphorique, on a vu que ces deux corps étaient assez exactement dans les proportions correspondantes au second phosphate de cuivre $Cu^2H^2(PO^4)^2$.

	Trouvé.	Calculé.
Rapport $\frac{P^2O^5}{Cu}$	0,80	0,89

La plus grande partie du cuivre fixe était donc sans doute à l'état de phosphate insoluble de cuivre, et la question se pose de savoir si ce phosphate agit comme antiseptique quand il est introduit dans un liquide nutritif. En semant dans un tel liquide du *saccharomyces cerevisiæ*, il n'y a pas eu de culture. Cela est sans doute dû à une solubilisation partielle du phosphate de cuivre par le phosphate acide de potassium certainement présent dans le liquide. En fait ce liquide s'est montré, après l'expérience, contenir des traces de cuivre en solution.

J'ai fait ensuite une nouvelle série d'essais quantitatifs dans lesquels, au lieu de séparer la levure par filtration, je me servais d'une machine centrifuge, ce qui supprimait diverses objections à la rigueur possibles contre la filtration. De plus le cuivre était déterminé par le titrage de l'iode mis en liberté par les sels de cuivre sur l'iodure de potassium. Voici le résumé de ces expériences. Dans chaque série la quantité de levure employée a été

la même, mais, en B, la solution de cuivre était plus forte qu'en A (comme on le voit dans la dernière colonne), et en C, la levure avait été préalablement chauffée avec de l'eau à 100_0.

	Temps de l'action.	Cuivre fixé en mgr. A	B	C.	Quantité totale de cuivre à l'origine en A, B, C.[1]
I	30 minutes	1,7	2,0	1,2	A = 21,2 mgr. B = 53 mgr.
	7 h. 15	2,7	3,0	1,2	C = 20,6 mgr.
II	30 minutes	3,3	4,0	—	A et C = 176 mgr.
	7 h. 15 à 7 h. 30	—	6,0	3,5	B = 88 mgr.

Ces expériences sur le sulfate de cuivre prouvent donc, je crois, qu'il y a une fixation du métal sur la levure, que la quantité fixée augmente légèrement avec le temps du contact ; que la levure bouillie en fixe pratiquement à peu près la même quantité que la levure non bouillie ; et que, dans ce cas, l'influence de la concentration est faible. On voit aussi que ce sont les produits solubles qui fixent la plus grande partie du cuivre : il y en a pourtant un peu fixé sur la substance de la cellule elle-même. Enfin cette fixation résulte, au moins pour la plus grande partie, de la formation d'un phosphate de cuivre insoluble que le liquide nutritif acide ou les sucs cellulaires acides peuvent ensuite solubiliser, lorsque l'atteinte portée à la cellule par sa formation n'est pas assez grande pour la tuer, et qu'elle peut commencer l'élimination de son toxique.

SELS DE FER, DE PLOMB ET DE MERCURE

Ces résultats obtenus avec le cuivre rendaient intéressante l'étude des sels métalliques doués d'une action analogue. J'ai étudié le sulfate de fer, l'acétate de plomb et de chlorure de mercure. Nous allons voir qu'il y a fixation dans tous les cas, mais que sa quantité ou ses conditions diffèrent.

L'action la plus voisine de celle du cuivre est peut-être celle du mercure. La quantité fixée est encore plus grande, comme l'indique le tableau suivant, composé comme celui qu'on a trouvé plus haut. On a séparé la levure par la machine centrifuge, et dosé le mercure par la méthode originale de Hannay (titrage avec le cyanure de potassium), soit avec la modification de Chapman-Jones (*Journal of the chem. Soc.*, 1892).

1. Les quantités de cuivre, de mercure, de fer et de plomb de ce tableau et des suivants sont celles que contiennent 50 c. c. du liquide sur lequel on opérait.

	Temps de l'action.	Mercure fixé, en milligr. A	B	C	Quantité totale de mercure à l'origine, en A, B, C.
I	15 minutes	27	40	28,5	A et C = 135 mgr
	24 heures	31,5	—	37	B = 405 »
II	15 minutes	52,5	—	55,5	A et C = 151,5 »
III	15 »	123	—	—	A = 196 »
	5 heures	128,5	278,5	—	B = 588 »

On voit que la quantité fixée est extrêmement grande: dans la dernière expérience, où elle est la plus forte, la quantité de levure employée contenait seulement 0gr,6 de matière sèche. Il est clair qu'il s'agit ici d'une fixation d'un métal très lourd sur la totalité de la matière albuminoïde, et non, comme plus haut, de la formation d'un sel insoluble aux dépens de l'un des éléments minéraux de la levure.

En arrivant aux sels de fer, nous allons trouver une importante différence. Jusqu'ici l'effet du chauffage de la levure à 100° n'a pas été grand. Il l'est au contraire beaucoup avec le sulfate de fer, sans doute à cause de l'insolubilité du phosphate $FeH^6(PO^4)^3$ formé aux dépens du phosphaté acide de potasse du contenu cellulaire. Voici les résultats de mes expériences.

	Temps de l'action.	Fer fixé, en milligrammes. A	B	C.	Quantité totale de fer à l'origine en A, B, C.
I	1 h. 45′ à 2 h.	6,9	--	26	A et C 29 mgr.
	22 à 24 h. 15′	8,2	—	26	
II	2 h. à 2 h. 45″	6,2	—	21,9	A et C 24,5 mgr.
	9 heures	8,9	—	22,3	

La séparation de la levure a été faite au moyen d'un filtre renversé, formé d'un tube de verre fermé par un papier à filtrer, et plongé dans le liquide, de sorte que la portion filtrée était prise dans la profondeur. On évite ainsi tout changement de composition du liquide dû aux effets de la capillarité. On a employé la machine centrifuge dans la série suivante, qui se rapporte aux effets de la concentration de la solution sur la quantité de métal fixé. On va voir que cet effet est considérable.

	Temps de l'action.	Fer fixé, en milligrammes A	B	C.	Quantité totale de fer à l'origine en A, B, C.
I	22 à 24 heures	9,2	19,3	—	A = 13,2 mgr. — B = 66 mgr.
II	15 minutes	9,6	21,5	—	A = 10,9 mgr.
	18 à 18 h. 15′	9,9	27,1	—	B = 43,8 —

J'arrive maintenant au dernier des métaux étudiés, le plomb. Celui-ci agit évidemment comme précipitant des matières orga-

niques de la levure. Mes résultats, surtout dans les séries I, II, et III, sont seulement approximatifs, mais ils n'en sont pas moins intéressants quand on les compare aux précédents.

Le plomb a été employé à l'état d'acétate et dosé à l'état de chromate, suivant la méthode de Frésenius. Les nombres suivants ont été obtenus après séparation par la centrifuge.

	Temps de l'action.	Plomb fixé, en milligrammes A	B	C.	Quantité totale de plomb à l'origine en A, B, C.
I	15 minutes	59	75,5	—	A = 198 mgr.
	26 h. 30′	—	85	—	B = 495 »
II	35 minutes	45	44	94,5	A et C = 198 »
	18 h. 45′	—	—	94,5	B = 495 »
III	30 minutes	41	49,5	79	A et C = 99 »
	20 heures	—	75,5	—	B = 379 »
IV	15 à 20 min.	38,8	48	—	A = 75,8 »
	19 h. 15′ à 20 h.	—	70	82,5	B et C = 379 »

Ces nombres, dans leur ensemble, sont concordants et placent ce métal auprès du fer, dont il diffère en ce qu'il y en a beaucoup plus de fixé par la même quantité de levure.

Tels sont mes résultats. Les conclusions auxquelles ils me conduisent peuvent être brièvement résumées de la façon suivante :

1° Avec certains sels métalliques doués de propriétés antiseptiques, la quantité d'antiseptique nécessaire pour tuer la levure augmente avec la quantité de levure. Avec le phénol on n'a pu constater, avec certitude, aucun effet pareil;

2° Avec les sels de cuivre, de plomb, de fer, et de mercure, l'effet antiseptique est dû à la fixation du métal par la levure. La quantité fixée varie d'un métal à l'autre, et, pour chaque métal, avec le temps de l'action, la dilution de la solution et les conditions de la levure;

3° Cette fixation est due, au moins en partie, à la formation d'un phosphate insoluble. En même temps, le métal est fixé d'une façon intime sur la paroi cellulaire. Il peut aussi, en outre, amener la précipitation de certains matériaux organiques de la cellule.

J'adresse, en terminant, tous mes remerciements à M. Duclaux, qui m'a inspiré l'idée de ce travail, et a bien voulu en surveiller l'exécution et la publication. Je remercie aussi M. Fernbach, en qui j'ai toujours trouvé l'aide et les conseils dont j'ai eu besoin.

RECHERCHES SUR LE POUVOIR ANTISEPTIQUE

DE

L'ALDÉHYDE FORMIQUE

PAR HENRI POTTEVIN

I

MÉTHODES DE DOSAGE

Les procédés jusqu'ici employés pour doser l'aldéhyde formique, ou formol, sont fondés sur sa transformation en aldéhydate d'ammoniaque suivant l'équation

$$6\,CH^2O + 4AzH^3 = C^6H^{12}Az^4 + 6\,H^2O.$$

O. Lœw (*J. f. prakt. Chemie*, t. XXXIII, p. 44) ajoute à la solution d'aldéhyde un excès de carbonate d'ammoniaque, évapore, dessèche à 100°, et pèse l'aldéhydate obtenu.

Trillat (*Comptes rendus*, 1893, p. 891) ajoute à l'aldéhyde de l'ammoniaque en excès; la portion qui n'entre pas en combinaison est chassée par un courant de vapeur d'eau, recueillie et dosée.

La décomposition très nette qu'éprouve à 100° l'aldéhydate d'ammoniaque en solution, et sa volatilité à l'état sec, rendent ces méthodes incertaines. On peut opérer avec plus de sûreté en utilisant les propriétés alcalines du corps $C^6H^{12}Az^4$, qui se comporte vis-à-vis des acides comme une base monoatomique, et dont la solution aqueuse, alcaline au méthylorange, est neutre à la phtaléine du phénol.

A la solution d'aldéhyde à titrer, on ajoute une quantité d'ammoniaque connue, telle qu'il en reste après combinaison un excès notable : on abandonne le mélange à la température ordinaire pendant 24 heures; la réaction étant alors terminée, on dose, à l'aide de la phénol-phtaléine, l'ammoniaque restée

libre; quand, par addition d'acide sulfurique, la coloration rouge a disparu, on ajoute du méthylorange, et on continue à verser de l'acide jusqu'à ce que la teinte passe au rouge franc : on évalue ainsi l'alcalinité totale du liquide.

Je me suis assuré que lorsqu'on sature par un acide un mélange d'ammoniaque et d'hexaméthylénamine : 1° c'est l'ammoniaque qui est saturée la première; 2° le dosage de l'alcalinité totale n'est pas influencé par la présence du sel ammoniacal résultant de cette saturation [1].

Avec de beaux cristaux d'hexaméthylénamine purifiée par cristallisation dans l'alcool, je prépare une solution à 1/10 exactement. Je prépare d'autre part une solution d'ammoniaque à 5 0/0; des mélanges de ces deux solutions sont titrés au moyen d'acide sulfurique normal.

La dernière colonne du tableau ci-dessous contient les quantités d'acide sulfurique nécessaires pour la saturation, calculées d'après les poids d'ammoniaque et d'hexaméthylénamine.

Eau distillée.	Sol. Amm. 5 0/0.	Sol. Hexam. 1/10.	Acide à la phtal.	Acide au Méthylor.	Acide total calculé.
35	1	3	2.8	5.2	5.1
15	12	3	34.2	37.6	37.4
40	1	10	2.9	10.3	10.0
10	12	10	34.4	42.5	42.4
20	1	20	2.8	17.3	17.1
0	12	20	34.1	49.7	49.5

Quand on sature l'ammoniaque en présence de phénol-phtaléine, la décoloration est graduelle, et il est difficile de fixer le moment précis où elle devient complète; mais si on s'arrête quand le liquide conserve encore une teinte légèrement rosée, on est sûr que l'approximation est par défaut. D'un autre côté, la limite exacte de saturation de l'aldéhydate est difficile à préciser avec le méthylorange, mais on est sûr d'avoir une évaluation par excès si on va jusques au rouge franc. On peut ainsi évaluer par défaut l'ammoniaque non combinée, et par excès la quantité totale d'alcali présente dans la liqueur (ammoniaque et aldéhydate); de ces deux données on tire facilement deux valeurs de la quantité d'aldéhyde soumise à l'essai : elles sont approchées la première par excès, la seconde par défaut.

1. Peut-être n'en serait-il pas de même s'il y avait un grand excès d'ammoniaque donnant lieu à un grand excès de sel ammoniacal. J'ai vu, en effet, que la présence du chlorhydrate d'ammoniaque dans une solution d'ammoniaque, qu'on titre à la phtaléine avec HCl, accélère le virage. Mais il faut que le sel soit assez concentré.

Appelons A le volume de la solution titrée d'acide nécessaire pour saturer l'ammoniaque employée, diminué de celui qui correspond à l'acidité propre de la solution soumise à l'essai;

b le volume qui produit le virage à la phtaléine;

c le volume qui produit le virage au méthylorange;

p le poids d'ammoniaque saturé par l'unité du volume d'acide;

P le poids d'aldéhyde essayé;

Nous aurons :

$$P = p\,[A - b] \times \frac{45}{17}$$

$$P = p\,[A - c] \times \frac{60}{17}.$$

Je donne ci-dessous, à titre d'exemple, les nombres obtenus en dosant une même quantité d'aldéhyde en présence de quantités croissantes d'eau distillée.

Sol. de dormol.	Eau distillée.	P. par excès.	P. par défaut.	Moyenne.
—	—	—	—	—
5 c. c.	0 c. c.	$1^{gr},76$	$1^{gr},74$	$1^{gr},75$
5 —	10 —	$1^{gr},76$	$1^{gr},73$	$1^{gr},75$
5 —	20 —	$1^{gr},76$	$1^{gr},75$	$1^{gr},75$
5 —	40 —	$1^{gr},76$	$1^{gr},73$	$1^{gr},75$
5 —	100 —	$1^{gr},76$	$1^{gr},74$	$1^{gr},75$

II

POUVOIR ANTISEPTIQUE

Il est bien établi aujourd'hui que, lorsqu'on fait l'étude d'un « antiseptique », il faut distinguer :

1° Le pouvoir antiseptique proprement dit, mesuré par la grandeur des doses capables de préserver les infusions organiques putrescibles de l'envahissement par les infiniment petits;

2° Le pouvoir bactéricide, mesuré par le temps de contact nécessaire pour tuer les germes microbiens, ou, pour mieux dire, pour les empêcher de se développer quand ils sont portés dans un nouveau milieu non additionné d'antiseptique.

Les deux pouvoirs ne vont pas nécessairement de pair. Au point de vue bactéricide, l'hypochlorite de chaux à 1/100 est

l'équivalent du sublimé acide à 1/100 : tous deux tuent, à la température ordinaire, les spores du *B. subtilis* en 15 minutes[1]. Pourtant, pour empêcher la culture du *B. subtilis* dans le bouillon, il faut ajouter à celui-ci 1/300 d'hypochlorite[2], tandis qu'avec le sublimé 1/10000 suffit.

Les doses d'antiseptique nécessaire pour empêcher la pullulation dans un milieu nutritif des germes qui y sont ensemencés varie avec la nature de ces germes : d'une façon générale elle sera d'autant plus faible que le milieu sera moins approprié à leurs besoins ou qu'ils seront eux-mêmes moins vigoureux. La germination des spores est toujours arrêtée par des doses incapables d'entraver le développement du microbe adulte. Ce sont là des notions courantes sur lesquelles il n'y a pas lieu d'insister : il n'en est pas tout à fait de même pour l'influence que peut avoir la quantité des germes introduits. Plus large est l'ensemencement, plus il faut d'antiseptique.

EXPÉRIENCE 1. — Des tubes à essai contenant chacun 10 c. c. d'un même moût de bière sont divisés en trois séries : *a*, *b*, *c*, et reçoivent des doses régulièrement croissantes de formol. Dans chaque série, la teneur en aldéhyde du premier tube correspond à 69 milligrammes par litre; la différence entre deux tubes consécutifs correspond à 23 milligrammes par litre.

Une certaine quantité de levure, représentant la culture totale obtenue dans 10 c. c. de moût, est séparée du liquide où elle a poussé, lavée trois fois à l'eau stérile (chaque lavage se fait en mettant les cellules en suspension pendant un quart d'heure dans 20 c. c. d'eau stérile et séparant à la turbine), puis délayée dans 10 c. c. d'eau stérile. On ensemence :

1° Avec 10 gouttes du mélange ainsi obtenu, les tubes de la série *a* ;

2° Avec une anse de platine du même liquide les tubes de la série *b* :

3° La série *c* et une autre série de 10 tubes témoins qui n'ont pas reçu d'antiseptique sont ensemencées avec une anse de platine d'un liquide obtenu en délayant dans 10 c. c. d'eau stérile une anse de platine du liquide qui a servi pour l'ensemencement des séries précédentes.

Le tout est mis à l'étuve à 23°.

L'examen des tubes fait au bout d'un mois a montré :

1° Que tous les tubes témoins avaient une culture ;

2° Que dans les autres séries il n'y avait pas culture dans les tubes renfermant des doses de formol égales ou supérieures à

69	milligrammes	par litre	pour la série	*c*.
110	—	—	—	*b*.
161	—	—	—	*a*.

1. CHAMBERLAND et FERNBACH, *Annales de l'Institut Pasteur*, t. VII.
2. CHAMBERLAND et FERNBACH (*Loc. cit.*).

Expérience II. — Je prépare un milieu nutritif avec :

Eau	1,000
Lactose	30
Bouillon Liebig.	2,5

Des tubes à essai contenant chacun 10 c. c. de ce liquide sont divisés en 20 séries. Les tubes de chaque série reçoivent des doses régulièrement croissantes de formol (la différence entre la teneur en aldéhyde de deux tubes consécutifs correspondant à 20 milligrammes par litre), puis sont ensemencés avec des quantités égales de levure. J'ai employé la levure alcoolique du lactose décrite par M. Duclaux. Les cellules, séparées du liquide où elles avaient poussé, lavées à l'eau comme celles qui ont servi pour l'expérience I, ont été mises en suspension dans l'eau stérile (5 grammes de levure fraîche pour 60 c. c. d'eau). En partant du mélange ainsi obtenu j'ai fait des dilutions dont chacune a servi pour l'ensemencement d'une série.

Les tubes ensemencés, fermés par des capuchons de caoutchouc, mis à l'étuve à 36°, ont été examinés au bout d'un mois.

Le tableau ci-dessous contient : 1° dans la colonne 1, des nombres proportionnels à la quantité de levure ensemencée; 1,000,000 correspond à 0gr,20 de levure fraîche; 2° dans la colonne II, les nombres représentant en milligrammes par litre la teneur en aldéhyde du dernier tube où la levure a vécu. Pour les tubes très largement ensemencés, où la semence aurait pu vivre sans pulluler d'une façon sensible, j'ai cherché si du lactose avait disparu.

I	II
2,000,000	300
1,000,000	200
250,000	140
100,000	140
10,000	140
2,500	120
1,000	120
250	120
100	80
75	120
50	60
25	80

De ces expériences, il ressort :

1° Que tant que la quantité de cellules ensemencées est petite, les doses d'antiseptique nécessaires pour empêcher la culture varient d'une façon irrégulière, dans des proportions notables; elles sont toujours inférieures à celles que nécessitent des ensemencements plus larges ; 2° à partir du moment où on a mis des germes en nombre suffisant, les irrégularités disparaissent et la

dose stérilisante reste fixe; elle s'élève à nouveau, d'une façon progressive, avec des ensemencements massifs.

Les irrégularités observées avec les ensemencements très faibles tiennent peut-être uniquement à ce que les cellules qui composent la culture-mère ayant chacune ses qualités spéciales et en particulier sa résistance propre vis-à-vis de l'antiseptique, il peut arriver, lorsqu'on en prend très peu, que tous les degrés de l'échelle de résistance ne soient pas représentés en chaque prise de semence. L'élévation de la dose stérilisante avec la quantité de semence provient d'une autre cause, d'ordre plus général.

Lorsqu'on met une quantité massive de levure en suspension dans un moût additionné de formol, celui-ci semble partiellement fixé par les globules; la teneur du liquide filtré en aldéhyde appréciable à la fuchsine décolorée par l'acide sulfureux diminue, et cette diminution, très supérieure à celle qui résulterait de la dilution si on remplaçait la levure par un égal volume d'eau, est trop brusque pour qu'on doive penser à une combustion. Pour préciser ces notions par des nombres immédiatement applicables à l'interprétation des phénomènes que nous avons en vue, il faut abandonner le formol, trop volatil et trop instable, et s'adresser à un antiseptique tel que le sulfate de cuivre, qui se comporte comme le formol et se prête mieux aux recherches.

Expérience III. — Avec du sucre blanc commercial et du sulfate de cuivre cristallisé pur dissous dans l'eau distillée, je fais cinq solutions contenant pour 100 c. c. :

	Saccharose en gr.	SO^4Cu en milligr.
I	5	319
II	5	128
III	5	64
IV	5	43
V	5	32

Avec chacune d'elles, je prépare une série de cinq ballons contenant :

	Solution cuivrique et sucrée en c. c.	Levure fraîche en grammes.
Ballon 1	100	10
— 2	100	8
— 3	100	6
— 4	100	4
— 5	100	2

La levure est une levure commerciale très pure ; avant d'être utilisée, elle a été lavée à l'eau, comme il a été dit précédemment. Le tout est abandonné à la température de 23°. Au bout de quelques heures, une fermentation très active s'établit dans les ballons suivants :

Ballons à 10 grammes de levure, séries V, IV, III.
— 8 — séries V, IV.
— 6 — série V.

Dans les autres, la levure reste inerte.

Après vingt-quatre heures de contact, je sépare à la turbine les cellules du liquide ambiant et je dose le cuivre restant dans celui-ci. Le tableau ci-dessous donne, exprimées en milligrammes, les quantités de SO^4Cu disparu, en supposant que tout le cuivre qui reste en solution est à l'état de sulfate.

Indication des ballons.	Indication des séries			
	I	II	III	V
1	105	77	53	32
2	?	66	47	27
3	65	51	37	23
4	39	32	27	22
5	20	16	13	12

Si nous comparons les résultats fournis par les ballons 1 de la série III et 4 de la série V, nous voyons que la quantité de cuivre disparu par gramme de levure introduite est à peu près la même dans les deux cas : la quantité qui reste dissoute à la fin de l'expérience est la même aussi ; pourtant, dans le premier ballon, une fermentation tumultueuse s'est établie en quelques heures, tandis que dans le second on n'a observé, après 24 heures, aucun dégagement gazeux. Cela prouve que la diminution de la teneur en cuivre soluble ne peut, à elle seule, expliquer l'abaissement du pouvoir antiseptique. Tout le cuivre ne reste pas à l'état de sulfate, une partie entre en combinaison avec les matériaux solubles diffusés hors des cellules. On est prévenu qu'il en est ainsi par le changement de teinte de la solution cuivrique : après l'addition de la levure, la couleur bleu faible du sulfate est remplacée par une couleur bleu d'azur beaucoup plus intense.

Il est probable que des combinaisons nouvelles prennent naissance aux dépens du sulfate de cuivre et des phosphates de la levure, car lorsqu'on ajoute du sulfate de cuivre à de l'eau de

levure, on observe un changement de teinte analogue à celui dont j'ai parlé, et il se produit un précipité de phosphate de cuivre; d'autre part, les liquides de l'expérience IV sont riches en phosphate dissous.

EXPÉRIENCE IV. — Dans trois ballons contenant 100 c.c. d'une solution de saccharose à 5 0/0 et ayant reçu 0gr,5, 0gr,2, 0gr,1 de SO^4Cu. je délaye 16 grammes de levure fraîche dont les cendres renferment 0gr,145 d'acide phosphorique. Après vingt-quatre heures de contact, je sépare les globules du liquide, je les lave à l'eau distillée sur un filtre à succion jusqu'à ce que les eaux de lavage ne renferment plus de cuivre : le liquide et les eaux de lavage sont évaporés, le résidu calciné, et, dans les cendres, je dose le cuivre et l'acide phosphorique; ce dernier est pesé à l'état de phosphate d'urane.

Poids de Cu prés. au début.	Poids de Cu restant dissous.	PO^4H^3 en solution.
0gr,254	0gr,186	0,094
0gr,101	,?	0,090
0gr,051	0gr,013	0,094

Les liquides contiennent aussi des quantités notables de matières albuminoïdes qui peuvent s'unir au sel métallique.

La diminution de la teneur en cuivre dissous peut être due, en partie, à une précipitation à l'état de phosphates insolubles accomplie tant à l'extérieur qu'à l'intérieur des globules; toutefois, l'examen microscopique des dépôts de levure ne m'a jamais révélé l'existence d'un précipité.

Dans l'expérience IV pour le ballon à 0gr,5 de sulfate, la quantité de cuivre disparu a été de 0gr,68. Pour précipiter ce cuivre à l'état de $(PO^4)^2Cu^3$ il faudrait 0gr,071 d'acide phosphorique: or sur 0gr,145 qu'en contenait la levure 0gr94 restent en solution, et le dépôt en renferme seulement 0gr,051 ; il est donc certain que tout le cuivre disparu n'est pas précipité à l'état de phosphate, et qu'une portion, qui varie avec les conditions de l'expérience, est fixée sur les globules par un mécanisme spécial.

Mais ces considérations sortent déjà du cadre de notre étude; la seule chose qu'il importe de retenir pour le moment, c'est que les antiseptiques n'exercent pas simplement des actions de présence après lesquelles leurs solutions conserveraient toutes leurs propriétés initiales. Ils s'unissent à la substance des microbes et sont immobilisés par elle. L'effet obtenu doit donc

dépendre des proportions d'antiseptique et de germes mis en présence.

L'expérience suivante vient encore à l'appui de ces conclusions et nous ramène à l'aldéhyde formique [1].

Expérience V. — Quatre ballons contenant respectivement 10, 50, 100, 1,000 cent. cubes d'un liquide nutritif identique à celui de l'expérience III, additionné de formol à la dose de 0 gr, 240 par litre, reçoivent chacun la même quantité de levure fraîche (levure du lactose de Duclaux), puis, fermés par des capuchons de caoutchouc, ils sont mis à l'étuve à 35°; au bout de 15 jours, la levure était morte dans le ballon de 1 litre et le lactose était intact : dans les autres, il avait partiellement fermenté.

III

POUVOIR BACTÉRICIDE

Nous avons vu, au chapitre précédent, que la quantité de germes ensemencés avait une influence sur la dose d'antiseptique nécessaire pour empêcher la culture : elle influe de la même façon sur le temps au bout duquel ces germes sont tués.

Expérience VI. Une certaine quantité de levure de bière représentant la culture totale obtenue dans 20 c. c. d'un moût de concentration moyenne est recueillie, lavée, et mise en suspension dans 10 c. c. d'eau stérile, dilution I.

1. Bien des auteurs : Trillat, Aronson, Berlioz, ont déterminé les doses de formol nécessaires pour empêcher la culture dans le bouillon des divers microbes pathogènes. Les nombres auxquels ils sont arrivés ne diffèrent pas de ceux que j'ai obtenus moi-même. D'une façon générale on peut dire que pour tous les microbes étudiés (bactéridie charbonneuse, bac. de la diphtérie, bac. pyocyanique, bac. du choléra, bac. typhique, *B. coli*, staphylocoque doré) la dose infertile est voisine de 0 gr, 05 par litre.

H. Schild (*Zeitschrift für Hygiene,* mars 1894) a dit que le bacille d'Eberth et le *Bacterium coli* présentaient vis-à-vis de l'aldéhyde formique des résistances très différentes : les doses infertiles seraient d'après lui 1/13000 pour le premier : 1/4000 pour le second. Ces affirmations sont en contradiction absolue avec celles de M. Berlioz aussi bien qu'avec le résultat de mes propres recherches. J'ai étudié des bacilles typhiques récemment retirés de la rate, et divers *B. coli* tirés des selles. Dans les bouillons fortement antiseptisés, le *B. coli* pousse généralement plus vite que le B. typhique, mais jamais il ne s'est développé en présence de doses d'aldéhyde supérieures à 0,07/1000.

Dans la pratique, chaque antiseptique a ses indications spéciales : les sels métalliques ne doivent être employés ni dans les milieux alcalins ni dans les milieux fortement albumineux ; l'aldéhyde formique agit très bien dans ces conditions, et n'est à rejeter que pour la stérilisation des liquides ammoniacaux. En milieu alcalin ou neutre, l'aldéhydate d'ammoniaque a un pouvoir antiseptique

2 gouttes de la dilution I diluées en 10 c. c. d'eau stérile dil. II.
2 II III.

De chacune de ces dilutions je prends 5 c. c. qui sont mélangés à 5 c. c. d'une solution de formol à 2 0/00; toutes les 5 minutes, je prélève dans ces mélanges une goutte qui est ensemencée dans 20 c. c. de moût de bière mis ensuite à 22°.

Avec les dilutions II et III, les ensemencements sont restés stériles dès la première prise; avec la dilution I, ils l'ont été seulement après 4 heures.

On voit que la même quantité de levure qui, semée dans 10 c. c., de liquide nutritif antiseptisé, a déterminé une fermentation très active, a été tuée quand on l'a mise en présence de 1 litre du même liquide.

Toutes les considérations que j'ai développées sur l'inégale résistance des germes qui composent une culture et sur les unions qu'ils peuvent contracter avec la substance antiseptique trouveraient leur place ici : je n'y reviendrai pas.

Le formol qui, lorsqu'il s'agit de stériliser un milieu de culture, est plus actif que le sublimé acide, lui est inférieur au point de vue de la rapidité d'action. D'une façon générale, on peut dire que les organismes sans spores, immergés, en petite quantité, dans la solution à 1 p. 1000 sont tués au bout d'un temps variable entre 15 minutes et quelques heures.

Pour me rapprocher autant que possible des conditions pratiques de la désinfection, j'ai surtout étudié l'action sur les germes desséchés sur des morceaux de toile.

Après avoir subi l'action de l'antiseptique, les germes et leur support étaient lavés pendant 1/2 heure dans l'eau stérile faiblement ammoniacale (1 gr. d'AzH^3 pour 10 litres d'eau), l'ensemencement d'épreuve était fait ensuite dans du bouillon de veau exactement neutralisé au tournesol et additionné de 1/10000 d'ammoniaque. Je me suis assuré qu'à cette dose l'ammoniaque ne retarde pas la germination des spores (*B subtilis* et *B. anthracis*), et la favorise plutôt. Les ballons mis à l'étuve à 35° ont été examinés un mois après l'ensemencement quand il s'est agi du *B. subtilis;* pour le charbon, les morceaux de toile qui, après huit jours, n'avaient pas donné de culture, étaient repris et introduits avec pureté sous la peau d'un cobaye.

à peu près nul; à la dose de 2 0/0, il n'empêche pas le *B. coli* de pulluler dans le bouillon; en milieu acide, il devient beaucoup plus actif; 350 milligrammes par litre empêchent le développement de l'aspergillus dans le liquide Raulin.

Spores de subtilis immergées dans la solution de formol à 15°.

La solution à	2 0/0	n'a pas tué en	30 heures.		
—	15 0/0	—	11	elle a tué en	20 heures.
—	12 0/0	—	4	—	6 —

Spores charbonneuses immergées dans la solution de formol à différentes températures.

15°	La solution à	2 0/0	n'a pas tué en	2 heures.		
	—	15 0/0	—	1 heure,	a tué en	1 heure 1/2.
	—	12 0/0	—	30 min.	—	1 heure.
35°	La solution à	2 0/0	n'a pas tué en	1 heure.		
	—	15 0/0	—	15 min.,	elle a tué en	30 min.
	—	12 0/0	—	5 min.	—	15 min.
52°	La solution à	2 0/0	n'a pas tué en	5 min.,	elle a tué en	15 min.
	—	15 0/0	—	—	—	5'
	—	12 0/0	—	—	—	5'

Spores du B. subtilis exposées aux vapeurs émises par la solution de formol à différentes températures.

Dans des flacons à large goulot d'une capacité de 400 c. c. je mettais 50 c. c. de la solution à étudier, un petit disque de porcelaine percé de trous était suspendu au bouchon, à 5 c. c. environ au-dessus de la surface du liquide. Les flacons stérilisés à l'autoclave recevaient la solution d'aldéhyde, puis étaient placés dans un bain-marie à température constante, sauf pour les expériences à 15° qui se faisaient à la température du laboratoire ; au bout de 2 heures, je disposais sur les disques flambés au préalable, les morceaux de toile, supportant les spores.

15°	La solution à	2 0/0	n'a pas tué en	56 heures.		
	—	15 0/0	—	56		
	—	12 0/0	—	30	— a tué en	44 heures
35°	La solution à	2 0/0	n'a pas tué en	6 heures,	elle a tué en	18 heures.
	—	15 0/0	—	2	—	6 —
	—	12 0/0	—	—	—	2 —
52°	La solution à	2 0/0	a tué en	2 heures.		
	—	15 0/0	—	1 heure.		
	—	12 0/0	—	1 —		

Spores de subtilis exposées aux vapeurs émises par la poudre de trioxyméthylène sèche.

La marche des expériences et le dispositif des appareils sont les mêmes que ceux adoptés pour l'étude des vapeurs émises par les solutions : celles-ci sont remplacées par une certaine quantité de poudre de trioxyméthylène : les flacons ont été laissés 24 heures au bain-marie avant l'introduction des germes.

Pour tuer les spores sèches du *B. Subtilis*, il a fallu 3 jours à 52° ; à 35° ce temps n'a pas suffi.

Les spores charbonneuses sèches ont été trouvées mortes après une exposition de 48 heures à 35°.

Les germes humides sont plus rapidement atteints que les germes secs. Si on prend les morceaux de toile qui ont servi aux expériences précédentes, au moment où ils viennent d'être souillés par la culture de *B. subtilis*, ou si, après qu'ils ont été desséchés, on les immerge pendant quelques heures dans l'eau stérile à la température ordinaire, on trouve qu'ils peuvent être stérilisés par une exposition aux vapeurs de trioxyméthylène de 24 heures à 35°.

Les expériences que je viens de rapporter prouvent que l'élévation de la température augmente considérablement le pouvoir bactéride de l'aldéhyde formique. Si nous les rapprochons de celles de MM. Chamberland et Fernbach (*l. c.*), nous voyons que lorsqu'il s'agit de tuer des germes plongés dans l'antiseptique à la température ordinaire, le chlorure de chaux à 1/10 et le sublimé acide à 1/100 sont plus actifs que la solution à 42 0/0 de formol; à 52°, ils n'agissent pas plus vite que la solution à 2 0/0. Dès que la température dépasse 35°, les vapeurs de formol, même sèches, sont douées d'une énergie qui les rend précieuses pour la pratique de la désinfection.

IV

ACTION SUR LES DIASTASES

Présure. — L'aldéhyde formique ajouté au lait retarde sa coagulation par la présure.

Les nombres suivants se rapportent à des expériences faites avec une solution neutre de formol à 40°.

Temps de coagulation du lait témoin en min.	Formol en gr. p. litre	R[1]
15	1	2
27	0,8	1,7
27	1,6	∞
27	2,4	∞
65	0,8	1,8
65	5,2	très grand
65	1,6	∞

Si la quantité de présure augmente, les doses nécessaires pour empêcher la coagulation s'élèvent.

1. R. représente le rapport qui existe entre les temps de coagulation du lait témoin et du lait antiseptisé.

La présure maintenue au contact des solutions concentrées de formol, devient inactive.

Sucrase. — O. Lœw (*Journal für praktische Chemie* (2), 37, p. 101) a étudié l'action du formol sur la sucrase, mais ses expériences sont viciées par une cause d'erreur inhérente au procédé par lequel il cherchait à apprécier la quantité de sucre interverti : il se contentait pour cela d'une lecture au polarimètre, or j'ai trouvé que l'aldéhyde formique, dont la solution n'a pas d'action sur la lumière polarisée, exagérait, dans le sens dextrogyre, le pouvoir rotatoire du saccharose.

Expérience : A des solutions contenant pour 100 c. c. 18gr,25 de saccharose, j'ajoute du formol aux doses suivantes :

Liquide	*a*	13,4 0/0
—	*b*	3,4 —
—	*c*	1,1 —

Le pouvoir rotatoire augmente brusquement d'abord, lentement ensuite, il atteint son maximum et demeure invariable après 3 heures pour le liquide *a*, après 1 heure pour les deux autres. Les valeurs auxquelles il arrive ainsi sont :

73°, 4	pour le liquide	*a*
69°, 1	— —	*b*
68°, 4	— —	*c*

Au lieu de 67°, 3, pouvoir rotatoire du saccharose.

La présence du formol modifie de même le pouvoir rotatoire de différents sucres : de l'acide tartrique, des tartrates. Je me borne pour le moment à signaler ces faits dont l'étude sera reprise.

Pour apprécier la quantité de sucre interverti, présent au sein d'une solution contenant du formol, j'ai transformé celui-ci en aldéhydate d'ammoniaque qui, je m'en suis assuré, ne réduit pas la liqueur de Fehling, puis j'ai dosé le sucre par réduction.

Expérience : Le liquide diastasifère a été obtenu au moyen de l'*Aspergillus Niger*, suivant la méthode indiquée par M. Duclaux, dans sa *Microbiologie*. L'interversion avait lieu à 54° en présence de 0,240 0/00 d'acide acétique. La solution sucrée était à 10 0/0. L'aldéhyde était emprunté à une solution neutre au tournesol.

Après 1 heure de séjour au bain-marie, les tubes à essai contenant les liqueurs en expérience recevaient une quantité de carbonate d'ammoniaque légèrement supérieure à celle qui était nécessaire pour neutraliser l'acide

acétique et transformer le formol en hexaméthylénamine, et étaient portés à l'ébullition pendant quelques minutes.

Formol en gr. p. 100 c. c.	Sucre int. en gr. p. 100 c. c.	R
—	—	—
0	3,3	—
0,1	2,9	1,1
1	2,3	1,4
5	1,4	2,4
0	1,2	
0,1	1,0	1,2
1	0,8	1,5
5	0,4	3.

Conservée au contact des solutions fortes d'aldéhyde, la diastase devient inactive au bout d'un temps d'autant plus long que la solution est moins concentrée.

La présence du formol ralentit aussi l'intervention du saccharose par les acides.

Les nombres suivants ont été obtenus en traitant à 54° une solution de saccharose à 10 0/0, par l'acide acétique à 4,6 0/0.

Formol en gr. p. 100 c. c.	Sucre int. en gr. p. 100 c. c.	R
—	—	—
0	1	
1	0,8	1,2
5	0,5	2
14	0,36	2,8

J'ai observé des retards semblables quand j'ai produit des forces inversives du même ordre, en remplaçant l'acide acétique par l'acide sulfurique, l'acide oxalique, l'acide tartrique.

De ces faits, on est en droit de conclure que si l'aldéhyde formique a une action directe sur la substance diastasique, dont l'activité spécifique est amoindrie, puis supprimée, elle intervient en outre pour modifier l'état des corps sur lesquels agit la diastase, et rendre plus pénibles les transformations qu'elle doit accomplir.

V

ACTION SUR LES ANIMAUX

L'aldéhyde formique n'est pas très toxique d'après Aronson et Trillat : en injection sous-cutanée, elle ne tue pas le cobaye à la dose de 0gr,53 par kilogramme; en injection intraveineuse, une dose de 0gr,038 par kilogramme est sans action sur le lapin ; ces nombres sont plus forts que ceux qui résultent de mes expé-

riences. Quand j'ai donné plus de $0^{gr},25$ par kilogramme sous la peau ou de $0^{gr},03$ par kilogramme dans les veines, les animaux sont presque toujours morts cachectiques au bout de quelques semaines. Dans ces cas, j'ai constaté la production constante de scléroses du tissu conjonctif sous-cutané, localisées surtout dans les régions inguinale et axillaire. Cette constatation, qui ne m'avait pas surpris quand l'aldéhyde était introduite sous la peau du ventre, m'a paru plus inattendue quand elle était injectée dans les veines de l'oreille. Lorsque j'ai essayé d'injecter, dans les veines de l'oreille d'un lapin, plus de $0^{gr},04$ de formol par kilogramme (j'employais une solution à 2 0/0), j'ai toujours déterminé la mort immédiate des animaux; à l'autopsie pratiquée aussitôt, je trouvais le sang coagulé dans toute l'étendue du système circulatoire (dans les poumons, dans les deux cœurs, dans l'aorte abdominale).

Des lapins pesant en moyenne 1,900 grammes ont pu, sans paraître souffrir de ce traitement, recevoir dans les veines, journellement pendant 4 jours, 2 c. c. d'une solution de formol à 2 0/0.

S'il est peu toxique, le formol est très irritant, et toutes les fois que j'ai injecté dans le tissu sous-cutané des solutions à 2, 1, 0,5 0/0, j'ai obtenu des nécroses de la peau qui se transformait en vastes escharres occupant parfois toute l'étendue de l'abdomen. Quand l'injection était faite dans les veines de l'oreille, celles-ci devenaient rouges, gonflées, et tous les tissus compris dans l'espace limité par le lacis des veines ainsi atteintes étaient nécrosés et tombaient.

Au cours d'essais de traitement de la teigne que j'ai rapporté ailleurs (*Société de Dermatologie,* 1894, p. 808), je me suis assuré que la solution à 2 0/0 était bien supportée par la peau, mais qu'il serait imprudent d'appliquer sur les téguments des solutions plus fortes.

Les vapeurs émises par les solutions concentrées et la poudre de trioxyméthylène sont très dangereuses à respirer. Un cobaye exposé pendant plusieurs heures dans un cristallisoir à double fond, incomplètement fermé, à la partie inférieure duquel on met une certaine quantité de formol à 42 0/0, meurt en quelques jours. Pour cette raison, l'aldéhyde formique ne devra être employée dans la pratique de la désinfection qu'avec une extrême prudence.

REVUES ET ANALYSES

SUR L'ALIMENTATION DES NOUVEAU-NÉS

REVUE CRITIQUE

Que faire quand la mère ne peut donner à son bébé que du lait de qualité médiocre ou en quantité insuffisante ? Voilà une question que les parents ont trop souvent à se poser, et qui peut recevoir bien des solutions. Il y a tout d'abord la nourrice, mais cette solution n'est pas seulement coûteuse ; elle a l'inconvénient plus grave de créer une lèpre sociale, qui fait naître des difformités partout où elle s'installe. Si on a détourné jusqu'ici ses regards de cette plaie, c'est qu'on la croyait inévitable ; une nourrice, même médiocre, semblait préférable au meilleur biberon. Mais là-dessus, comme sur tant de points, les idées pastoriennes ont amené une révolution. En nous montrant que le lait est surtout dangereux par les microbes qu'il contient, elle nous ont donné la raison de la supériorité du lait de la nourrice, toujours *frais* au moment ou il est absorbé; mais elles nous ont permis aussi de préparer un lait stérile, dont l'introduction dans l'alimentation des nouveau-nés a été un véritable bienfait, ainsi qu'en témoignent tant de statistiques, parmi lesquelles il faut faire une place à part à celles du professeur Budin, publiées récemment dans les la *Revue des Sciences* de M. Olivier (1894).

Il est clair que ce lait alimentaire, stérile au moment où il sort du sein ou du flacon bouché qui le contient, ne reste pas longtemps à cet cet état. Il rencontre dans la bouche de l'enfant, dans son estomac, des microbes nombreux, et peut se peupler autant, au bout d'une heure ou deux de séjour, qu'un lait conservé comme à l'ordinaire 12 ou 24 heures dans une laiterie. Mais si la quantité des microbes est pareille, l'expérience apprend que la qualité n'est pas la même dans les deux cas. Ceux qui contaminent de préférence le lait dans la laiterie sont surtout des ferments lactiques dangereux pour l'estomac encore gélatineux de l'enfant, dangereux peut-être par l'acidité qu'ils y apportent, dangereux peut-être aussi (cette question mériterait

d'être élucidée) en ce qu'ils provoquent une rapide coagulation du lait aussitôt que celui-ci est arrivé dans l'estomac, et donnent à la caséine précipitée la forme de gros grumeaux difficiles à dissoudre. Les microbes qui tapissent la bouche, l'estomac, et le canal intestinal de l'enfant nourri au sein ou au lait stérilisé sont d'une toute autre nature. Ce sont des filaments fins, ne se décolorant pas par la méthode de Gram, et qui appartiennent à la tribu des *tyrothrix* aérobies, puissants producteurs de présure, dont j'ai autrefois décrit quelques espèces. Les selles ont une réaction très légèrement acide, une consistance d'onguent, et on n'y voit, au microscope, que des globules gras et des flocons amorphes de caséine, en dehors des éléments figurés provenant de l'épiderme ou des microbes du canal digestif.

Toutefois, ce n'est pas tout que d'assurer au bébé un lait aussi stérile que celui qu'il pourrait trouver au sein de sa mère ou de sa nourrice, il faut encore, autant que possible, assurer l'identité de composition.

Tout canal digestif a à la fois ses exigences et ses habitudes, mais lorsque, comme chez le nouveau-né, il est encore pour ainsi dire à l'état diffluent, il veut être infiniment respecté. Il est fait pour recevoir un aliment déterminé, contenant la matière grasse, la caséine, le sucre de lait, les sels minéraux dans des proportions déterminées, différentes de celles qu'exigerait le nouveau-né dans une autre espèce animale. C'est dire que, *a priori*, le lait de vache, de jument, ne convient pas plus à l'enfant qui vient de naître que le lait d'une jeune maman ne conviendrait à un veau. Le lait de vache, en particulier, contient plus de caséine et moins de sucre de lait que le lait de femme. Il est à peu près aussi riche en matière grasse. L'expérience apprend que l'enfant, tout jeune, ne peut pas le supporter : il faut l'étendre d'eau, de façon à amener sa caséine au même taux que dans le lait de femme. Le mode de coagulation dans l'estomac est alors à peu près le même qu'avec l'enfant nourri au sein : les flocons de caséine sont légers, gélatineux, franchissent facilement le pylore pour aller se présenter à l'action digestive du pancréas, la digestion stomacale est brève, et l'enfant reste en appétit. Mais cette affusion d'eau n'en a pas moins des inconvénients. Si elle a l'avantage de ramener la caséine au même taux que dans le lait de femme, elle abaisse trop celui de la matière grasse qui doit rester voisin de 3 0/0, et aussi celui du sucre de lait, qui était déjà en déficit dans le lait de vache, et qui l'est encore plus après coupage. En moyenne, il tombe à 2,5 0/0, alors qu'il devrait se tenir au-dessus de 6 0/0.

Le problème n'avait pas de quoi embarrasser les hygiénistes. Il manque de la matière grasse et du sucre de lait, ont-ils dit; il suffit

d'en rajouter, et les propositions à cet effet n'ont pas manqué. On peut augmenter la proportion de matière grasse en ajoutant, au lait étendu d'eau, soit de la crème, fraîche ou conservée, soit du lait provenant des dernières portions de la traite, qui est, comme on sait, le plus riche en beurre. On peut de même, augmenter la proportion de sucre de lait en ajoutant soit du sucre de lait en nature, soit du petit lait, qui peut être considéré comme n'apportant que des sels minéraux et du sucre de lait. Mais tous ces mélanges avaient comme un vague parfum de pharmacie. Du lait qu'on étend d'eau, qu'on édulcore ensuite avec un sirop ou une façon de looch crémeux, a perdu son air d'innocence, et il ne faut pas s'étonner si ces pratiques ne se sont pas répandues, malgré le nom et l'autorité de ceux qui les recommandaient.

Peut-être un meilleur sort est-il réservé à une méthode récemment étudiée par M. le Dr Gaertner[1], et qui repose sur l'emploi de l'écrémeuse centrifuge. On sait quel est le principe de ses appareils. Imaginons un vase ventru, en forme de toupie tournant autour d'un axe vertical, et partagé par une cloison horizontale en deux compartiments l'un supérieur, l'autre inférieur, qui communiquent par une série d'ouvertures pratiquées sur tout le pourtour extérieur de la cloison horizontale. Faisons arriver du lait dans l'un de ces compartiments, l'inférieur par exemple. Le mouvement de la turbine va le coller le long des parois sur lesquelles il formera deux couches. La plus centrale, la plus voisine de l'axe contiendra le beurre, l'autre sera faite de lait écrémé et des matières lourdes contenues dans le lait, telles que cellules épithéliales, débris divers, poils et fragments de bouse de vache, microbes, etc. Cette couche collée le long des parois filera dans le compartiment supérieur par les ouvertures du pourtour, de sorte qu'en enfonçant dans les deux compartiments deux collecteurs ramassant le liquide qui en s'accumulant arrive à leur contact, nous pourrons trouver dans le compartiment inférieur du lait enrichi en crème, dans l'autre du lait écrémé. Si on étend de son volume d'eau le lait avant de l'introduire dans la turbine, et si on s'arrange pour puiser dans les deux compartiments des volumes égaux de liquide, il est clair que celui du compartiment inférieur comprendra la totalité ou la presque totalité de la matière grasse du lait primitif, et seulement la moitié de sa caséine ou de son sucre de lait. Ce n'est pas encore du lait de femme, puisqu'il y manque du sucre de lait, mais cela vaut mieux que du lait de vache étendu d'eau, puisque, par une simple opération mécanique, on en a augmenté et ramené à un niveau convenable la proportion de matière grasse.

Ce lait, essayé par M. Escherich, dont tout le monde reconnaît la

1. *Uber die Herstellung der Fettmilch*, Vienne, 1894.

compétence, dans un service d'hôpital[1], a donné de bons résultats et semble destiné à se répandre. Il est vrai qu'il y a encore quelque chose d'artificiel dans la confection de cet aliment de la première enfance, mais tout est artifice quand la mère manque ou se refuse à son devoir, tout, jusques et y compris la nourrice.

E. DUCLAUX.

INSTITUT PASTEUR

Personnes mortes de rage pendant le traitement.

RICHAUD (Joseph), 4 ans ; le père cultivateur à Beaussemblant (Drôme). Mordu le 4 octobre par un chien errant; le chien a été abattu le même jour et reconnu enragé par M. Belin, vétérinaire à Beaussemblant. L'enfant présente sur l'aile gauche du nez une morsure, et à l'avant-bras droit, face antérieure et face postérieure, tiers inférieur, 3 morsures ; toutes ont bien saigné. Les plaies ont été cautérisées au nitrate d'argent 3 heures après. Richaud est traité du 7 au 27 octobre. Le 3 novembre l'enfant est pris de douleurs et de fourmillement dans le bras mordu, il a en même temps des spasmes laryngo-pharyngiens. Il succombe le 6 novembre dans la paralysie (observation du Dr Pangou de Saint-Vallier, Drôme).

BENTLEY (James), 18 ans, mineur, à Claytonlemoores, comté de Lancastre, Angleterre.

Mordu le 18 octobre par un chien errant, reconnu enragé par un vétérinaire, Bentley se présente le 23 octobre. Il porte à la main gauche 5 morsures sur les 2e et 3e phalanges du médius et de l'annulaire. Toutes ont bien saigné. Cautérisées au sublimé à 1 0/0 une demi-heure après. Le 8 novembre (18e jour du traitement), Bentley est pris de rage; douleurs dans la main et le bras jusqu'à l'épaule, spasmes et étouffements (observation du Dr Roux). Transporté à l'hôpital Necker, il meurt le 10 novembre, à 6 heures du matin.

Cinq personnes, mordues par le même chien, sont encore en bonne santé.

Personnes mortes de rage après le traitement.

DESQUINCOURT (Julie), 43 ans, de Liévin (Pas-de-Calais).

Mordue le 16 février à la joue droite, au niveau du bord inférieur

1. *Die Gartner'sche Fettmilch*, Vienne, 1894.

de la cavité orbitaire. La morsure pénétrante avait bien saigné et n'avait pas été cautérisée. Le chien mordeur avait été déclaré enragé après autopsie par M. Parisse, vétérinaire à Lens.

Mme Desquincourt, traitée à l'Institut Pasteur du 18 février au 10 mars, est morte de la rage le 12 juillet.

Delepine (Pierre), 15 ans, de Grostheil (Eure). Mordu le 16 juin, traité à l'Institut Pasteur du 17 juin au 7 juillet, mort de la rage le 12 août.

Le jeune Delepine avait reçu sur les deux mains et sur les avant-bras 34 morsures; toutes très pénétrantes, quelques-unes avaient été touchées au nitrate d'argent après une heure.

Un cobaye inoculé avec le bulbe du chien mordeur, le 18 juin, est mort de la rage le 24 août.

Quatre autres personnes mordues en même temps que Delepine sont actuellement en bonne santé.

Stevenson Malcolm, 25 ans, officier au 93e Highlander à Dalhousey (Indes anglaises). Mordu le 10 juin, traité à l'Institut Pasteur du 1er au 15 juillet, mort de la rage le 1er août; les premiers symptômes rabiques se sont manifestés vers le 28 juillet.

Stevenson avait reçu à la main droite une morsure pénétrante, lavée à l'ammoniaque après 1 heure. L'animal mordeur, un chien errant, avait été abattu et examiné par le médecin du régiment qui avait prescrit l'envoi de Stevenson à l'Institut Pasteur.

Vayre (Louis), 5 ans, de Bize (Aude).

Mordu le 29 juin, traité à l'Institut Pasteur du 8 au 25 juillet, mort de la rage le 1er septembre.

Les morsures, au nombre de huit, toutes pénétrantes, siégeaient sur la périphérie de la jambe droite, elles avaient été faites sur le membre nu et n'avaient pas été cautérisées.

Le chien mordeur avait été reconnu enragé à l'autopsie par M. Maury, vétérinaire à Ginestas.

INSTITUT PASTEUR

STATISTIQUE DU TRAITEMENT PRÉVENTIF DE LA RAGE.

JUILLET, AOUT ET SEPTEMBRE 1894.

	A			B			C		
Morsures à la tête et à la figure — simples	»	1	2	»	8	17	»	2	5
Morsures à la tête et à la figure — multiples	»	1		»	9		»	3	
Cautérisations efficaces	»	»	»	»	»	»	»	»	»
— *inefficaces*	1	»	»	4	»	»	2	»	»
Pas de cautérisation	1	»	»	13	»	»	3	»	»
Morsures aux mains — simples	»	6	12	»	48	105	»	13	29
Morsures aux mains — multiples	»	6		»	57		»	16	
Cautérisations efficaces	6	»	»	3	»	»	»	»	»
— *inefficaces*	6	»	»	34	»	»	14	»	»
Pas de cautérisation	»	»	»	68	»	»	15	»	»
Morsures aux membres et au tronc — simples	»	1	7	»	28	81	»	13	47
Morsures aux membres et au tronc — multiples	»	6		»	58		»	34	
Cautérisations efficaces	»	»	»	»	»	»	»	»	»
— *inefficaces*	4	»	»	40	»	»	33	»	»
Pas de cautérisation	3	»	»	41	»	»	14	»	»
Habits déchirés	5	»	»	57	»	»	38	»	»
Morsures à nu	2	»	»	16	»	»	9	»	»
Morsures multiples en divers points du corps	»	»	»	»	3	3	»	3	3
Cautérisations efficaces	»	»	»	»	»	»	»	»	»
— *inefficaces*	»	»	»	1	»	»	2	»	»
Pas de cautérisation	»	»	»	2	»	»	1	»	»
Habits déchirés	»	»	»	1	»	»	2	»	»
Morsures à nu	»	»	»	2	»	»	1	»	»
Totaux. — Français et Algériens		15	21		174	206		76	84
Totaux. — Etrangers		6			32			8	
		A			B			C	
TOTAL GÉNÉRAL					311				

Les animaux mordeurs ont été : chiens, 292 fois ; chats, 19 fois.

Le Gérant : G. MASSON.

Sceaux. — Imprimerie Charaire et Cie.

8me ANNÉE DÉCEMBRE 1894 N° 12.

ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

RECHERCHES SUR LA PRODUCTION DU BACILLE DU CHARBON ASPOROGÈNE

PAR MM.

H. SURMONT
Professeur agrégé à la Faculté de Médecine de Lille.

E. ARNOULD
Médecin aide-major de 1re classe au 19e régiment de chasseurs.

I

Il est vraiment digne de remarque que l'attention du monde savant ne se soit pas fixée, dès le premier jour, sur la découverte si importante faite en 1883 par MM. Chamberland et Roux[1], de la possibilité de créer artificiellement des races de bactéridies asporogènes, c'est-à-dire ayant perdu d'une façon définitive la propriété de donner des spores, car, de tout temps, les fonctions de reproduction ont été considérées comme des plus fixes, et ont donné aux naturalistes des caractères de classification rangés parmi les meilleurs. Cela tient probablement à ce que la question du polymorphisme des bactéries, et notamment d'un certain nombre d'espèces pathogènes, alors débattue entre les botanistes, n'avait pas su solliciter encore l'intérêt de la grande masse des microbiologistes; en outre la découverte de MM. Chamberland et Roux se trouvait dissimulée, pour ainsi dire, dans un travail de la plus haute importance sur l'atténuation de la virulence de la bactéridie charbonneuse sous l'influence des substances antiseptiques.

1. CHAMBERLAND et ROUX. *Académie des sciences*, séance du 9 avril 1883 (C. R., vol. XCVI, p. 1088).

Les bactéridies asporogènes avaient été obtenues par la culture de sang charbonneux dans des ballons contenant un bouillon additionné de 1/2000 de bichromate de potasse. Dans ces conditions, les cultures, disent les auteurs, « à partir du 8e jour après le début de l'expérience, n'ont jamais donné de germes, et il en a été de même pour toutes les cultures successives issues de celles-ci. Ces bactéridies incapables de former des spores, inoculées à des cobayes, les font périr en 3 ou 4 jours. Une gouttelette de leur sang, semée dans du bouillon, donne une abondante culture de bactéridies qui ne produisent pas de germes. Elles restent à l'état de filaments, et, au bout de 30 ou 40 jours, finissent par périr. Voici donc une variété de bactéridies qui a perdu la propriété de faire des spores, et qui ne la retrouve pas même après avoir passé par l'organisme de cobayes. »

On voit par la clarté de ce passage, que nous avons tenu à citer, toute la netteté de la découverte; cependant, en 1887, Lehmann[1], ayant rencontré, par hasard, dans des cultures anciennes sur gélatine qui se trouvaient dans le laboratoire de Koch, et qui provenaient de sources diverses, du charbon asporogène, crut être le premier à l'observer. Au lieu de spores, il trouva dans ces tubes de petits corps très réfringents, se conduisant différemment vis-à-vis des réactifs colorants, mais il se contenta d'en faire l'examen microscopique, et ne s'assura pas, par le chauffage à 65° pendant 15 minutes, de l'absence réelle de germes. Des inoculations faites avec ces races de bacilles asporogènes, Lehmann conclut que la fonction sporogène est tout à fait indépendante de la virulence, mais il ne put arriver à savoir dans quelles conditions les microbes qu'il observait avaient ainsi perdu la propriété de donner des spores.

Behring[2] a consacré quelques pages au charbon asporogène. Cet auteur a d'abord essayé de déterminer quelques-unes des conditions dans lesquelles le bacille du charbon forme des spores à l'état normal, en se servant du procédé de recherches suivant : il prépare des milieux de culture contenant en proportion déterminée les diverses substances dont il étudie l'influence

1. LEHMANN. *Sur la formation des spores du charbon*, Société d'anatomie et de physiologie de Munich (*Münchener medicinische Wochenschrift*, juin 1887).
2. BEHRING. *Beitrage zur Aetiologie des Milzbrandes* (*Zeitschrift f. Hygiene*, t. VII, 1889).

sur la sporulation, puis fait avec les milieux ainsi modifiés des cultures en gouttes suspendues qu'il examine après 16 heures de séjour à l'étuve. Dans les conditions normales, la sporulation est déjà évidente ; avec certaines substances, elle est retardée plus ou moins longtemps, suivant les conditions de l'expérience, c'est-à-dire, par exemple, suivant la dose ajoutée au milieu de culture. De cette première partie de son travail, dont le détail ne saurait nous retenir ici, Behring a cru pouvoir conclure que, d'une façon générale, la moitié ou les deux tiers de la quantité d'un antiseptique qui suffit à arrêter le développement du microbe entrave ou supprime la formation des spores. Nous devons noter que Behring s'est contenté de l'examen microscopique pour affirmer l'absence de spores, et n'a jamais eu recours à l'épreuve de la chaleur dont Roux a fait connaître l'utilité.

Cherchant ensuite à rendre des bacilles du charbon définitivement asporogènes, Behring y réussit avec deux espèces, l'une de charbon virulent, l'autre de charbon atténué, et mieux avec ce dernier qu'avec le charbon virulent. Ce résultat fut obtenu par la culture du charbon pendant 2 à 3 mois, à la température de la chambre, dans de la gélatine à 8 0/0 renfermant 1 c. c. d'acide chlorhydrique pour 100 c. c. dans un cas, et dans l'autre de l'acide rosolique jusqu'à forte coloration rosée de la gélatine. L'auteur fait d'ailleurs toutes ses réserves au point de vue des doses d'acide qui lui ont réussi : elles peuvent varier, étant donné que les milieux nutritifs ne sont jamais exactement identiques d'une expérience à l'autre. Par suite, il faut toujours procéder par tâtonnement.

Dans la même expérience, deux autres espèces de bacilles provenant de gélatines additionnées d'HCl ou d'acide rosolique ont donné des cultures non sporulées lors d'un premier ensemencement sur gélose, mais ont repris des spores dans les cultures ultérieures. Au contraire, les deux variétés signalées plus haut restent asporogènes, même quand on cherche à favoriser la formation des spores, entre autres moyens, par l'addition de chaux aux milieux de cultures.

Pas plus que Lehmann, Behring ne semble avoir eu connaissance du procédé par lequel Chamberland et Roux avaient obtenu du charbon asporogène. C'est ce que Roux fait remar-

quer dans un nouveau mémoire sur ce sujet[1]. En même temps, il décrit une méthode destinée à faciliter la préparation de races de bactéridies asporogènes aux expérimentateurs qui en auraient besoin. Ceci laisse supposer que Roux a reconnu que le bichromate de potasse ne donne pas toujours très aisément de bons résultats. Cette fois, il sème du sang d'un cobaye qui vient de succomber au charbon dans des tubes de bouillon de veau additionnés de 2, 4, 6, 8 .... 20 p. 10000 d'acide phénique. Au bout de 8 à 10 jours de culture, la bactéridie est définitivement asporogène dans un certain nombre de tubes ainsi préparés. Les détails de l'expérience précisés par Roux ont la plus grande importance; nous y reviendrons plus loin.

Tandis que Behring et Roux ont employé des substances chimiques, Phisalix[2] utilise l'action de la chaleur. Se fondant sur le fait, démontré par Pasteur, qu'à la température de 42° la bactéridie ne forme pas de spores, Phisalix pense qu'on arrivera à fixer ce caractère passager si l'on peut faire agir plus longtemps la température de 42° sur le microbe sans qu'il meure, et, mieux encore, si on peut opérer sur de nombreuses générations successives. Dans ce but, il reporte tous les cinq jours dans un nouveau bouillon la bactéridie maintenue à 42°, et par ces cultures en série il obtient, au bout de cinq ou six ensemencements, une race qui a définitivement perdu la propriété de donner des spores, dans les conditions ordinaires du moins.

II

Les travaux que nous venons de résumer ont donc démontré, d'une part, que le charbon peut devenir spontanément asporogène dans les laboratoires, particulièrement dans certaines vieilles cultures sur gélatine (Lehman) ; d'autre part, que l'on peut produire à volonté ces races spéciales de *bacillus anthracis*, soit à l'aide d'agents chimiques, bichromate de potasse (Chamberland et Roux), acide phénique (Roux), acide chlorhydrique et acide rosolique (Behring), soit en faisant agir la température de 42°

1. Roux. *Bactéridie charbonneuse asporogène* (*Annales de l'Institut Pasteur*. 1890, p. 25).

2. C. Phisalix. *Influence de la chaleur sur la propriété sporogène du bacillus anthracis, abolition persistante de cette fonction par hérédité des caractères acquis*. (*Archives de physiologie*, 1893, p. 217.)

sur des cultures successives en série (Phisalix) : mais en même temps, ils ont mis en relief ce fait qu'il n'est pas toujours facile de réussir ces expériences. Behring n'a obtenu de charbon asporogène que dans deux cas. Roux dit expressément qu'il y a un certain aléa dans cette recherche : « La proportion d'antiseptique nécessaire pour empêcher la formation des spores varie avec la composition du bouillon, l'origine de la bactéridie, la facilité d'accès de l'air dans la culture... Il y a souvent des résultats imprévus dans ces expériences : on voit par exemple un tube à 6/10000 d'acide phénique ne pas donner de spores, tandis qu'un autre à 10/10000 en contiendra, bien que tous deux aient été ensemencés avec le même sang charbonneux. » Phisalix ne le dit pas, mais il est probable qu'il a observé de semblables variations dans ses résultats. En pratique, on voit que les nombreux auteurs qui ont utilisé la bactéridie asporogène, dans les travaux sur le charbon publiés dans les dernières années, ont presque tous employé des cultures provenant de l'Institut Pasteur.

Pour nous, ayant essayé, dans un but spécial, de nous procurer du charbon asporogène, au mois d'avril 1893, nous avons éprouvé des difficultés plus grandes que nous ne le prévoyions, et, en cherchant à nous les expliquer, nous avons été amenés à faire un certain nombre d'expériences dont nous croyons devoir publier un court résumé, afin d'éviter, si possible, une perte de temps aux bactériologistes qui s'engageraient dans la même voie que nous. Nous avons déjà donné sur ce sujet une courte note aux *Comptes rendus de la Société de Biologie* [1].

A. — Préparation du charbon asporogène par les bouillons additionnés d'acide phénique (procédé de Roux).

Il va sans dire que dans toutes nos expériences nous nous sommes conformés rigoureusement aux recommandations de Roux; nous avons opéré avec du bouillon de veau peptonisé, légèrement alcalin, préparé avec une partie de viande et deux parties d'eau, réparti dans des tubes à essai par fractions de 10 c. c. Après l'addition de l'eau phéniquée préparée sans

1. H. Surmont et E. Arnould. *Sur les différents procédés permettant d'obtenir du charbon asporogène.* (Soc. de Biologie, 17 mars 1894.)

alcool, dans les proportions voulues (de 1 p. 10,000 à 20 p. 10,000), les tubes sont fermés à la lampe, afin de prévenir l'évaporation pendant la stérilisation à l'autoclave; on les ensemence avec le sang d'un cobaye qui vient de succomber au charbon, en ayant soin de ne pas mettre de sang sur les parois du tube, hors du bouillon; enfin on met les tubes soigneusement encapuchonnés à l'étuve, et l'on veille scrupuleusement à empêcher le développement de la bactéridie en collerette, à la surface du bouillon, ce qui aurait encore pour résultat de la soustraire à l'action de l'antiseptique. Nos expériences ne diffèrent de celles de Roux que sur un point : nos cultures ont été faites à la température de 36°-37°, celles du savant professeur de l'Institut Pasteur à 33°.

Pour constater la présence ou l'absence des spores, nous avons eu recours dans tous les cas à l'épreuve du chauffage à 65° pendant 15′ des bouillons de culture, recueillis dans des pipettes capillaires plongées entièrement dans l'eau chaude.

Les résultats que nous avons obtenus sont assez variables, ainsi qu'on le verra par le détail des faits.

1° *Expériences avec le charbon dit de Marcq.* — Les premières expériences que nous fîmes pour nous procurer un charbon asporogène par le procédé de Roux furent entreprises avec un charbon très virulent, que nous avions recueilli chez l'homme, dans des circonstances relatées dans un autre mémoire [1]. Ce charbon était au laboratoire depuis cinq mois et demi quand on le fit servir aux premières expériences. Nos essais furent d'abord malheureux; un grand nombre de tubes de bouillon phéniqué nous donnèrent des bactéridies dépourvues de spores dans beaucoup de cultures d'origine, mais en reprenant régulièrement dès le premier passage dans un bouillon normal; de sorte que ce ne fut qu'après un assez grand nombre d'expériences que nous eûmes du charbon définitivement asporogène.

Un court résumé de nos expériences indiquera plus nettement ces résultats.

Les 8 *avril*, 13 *avril*, 11 *juillet* 1893, nous ensemençons *quatre séries, A, B, C, D,* chacune de dix tubes phéniqués à 2/10000, 4/10000,... 20/10000. Une fois pour toutes et pour abréger nous désignons dans chaque série les tubes

1. H. Surmont et E. Arnould. *Une épidémie de charbon chez des ouvriers brossiers.* (*Revue d'hygiène et de police sanitaire*, 1893, n° 3.)

sous les nos 1, 2, 3... 10, chaque numéro contenant 2/10000 d'acide phénique en plus que le précédent, le no 1 étant le moins phéniqué. Ces 40 tubes donnent du 10e au 12e jour les résultats suivants : 23 tubes ne contiennent plus de spores, 5 en contiennent encore, 12 n'ont pas cultivé. Ces derniers correspondent aux plus fortes doses d'antiseptiques; les tubes no 1 ont au contraire continué tous à sporuler ainsi qu'un no 3.

La série C est seule l'objet d'un examen plus prolongé. On fait avec les quatre tubes 2, 4, 5, 6 qui n'ont pas de spores, des cultures filles qui toutes sont sporogènes.

Cette première constatation ne pouvait manquer d'exciter notre intérêt, car dans les expériences annexées au mémoire de M. Roux, on voit les tubes fournir du charbon asporogène dès le 10e (2e expérience) et le 12e jour (1re expérience). Notre race de bactéridie semble donc mieux fixée, plus stable dans sa fonction sporogène, et dès lors, notre premier soin est de laisser les cultures plus longtemps en contact avec l'antiseptique.

Le 19 *août* 1893 (*série E*) on ensemence avec du sang charbonneux cinq tubes phéniqués des nos 3, 4, 5, 6, 7, les expériences précédentes nous ayant appris que ce sont là les dilutions les plus favorables à la disparition des spores. Le 29 *août*, 10e jour de séjour à l'étuve, il n'y a plus de spores dans les tubes d'origine, mais on en retrouve dès le 2 *septembre* dans toutes les cultures filles. Ce jour-là (14e jour), une nouvelle épreuve donne les mêmes résultats. Le 13 *septembre*, 25e jour après l'ensemencement, la bactéridie n'est plus vivante que dans le tube 3 : elle n'y a pas de spores, mais en reprend immédiatement dans le bouillon de veau ordinaire. On enlève la culture de l'étuve et on la garde à la température de la chambre dans un coin peu éclairé. Le 25 *octobre* (66e jour de culture) une nouvelle épreuve donne les mêmes résultats que précédemment.

Série F. Le 13 *novembre* 1893, on ensemence une série de dix tubes qui, examinés les 23 *novembre*, 28 *novembre* et 6 *décembre*, par conséquent jusqu'au 23e jour, ne donnèrent jamais de cultures filles définitivement asporogènes.

Série G. Le 17 *décembre* 1893, une série de sept tubes 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 est ensemencée. Le 28, au 11e jour, elle donne dans les nos 3, 4, 5 du charbon resté asporogène depuis, malgré de nombreux passages par les différents milieux de culture.

Les autres tubes de cette série ont donné les résultats suivants : 7 et 8 sont restés stériles, 6 a été brisé par accident le 10e jour, avant la vérification : il avait poussé en troublant légèrement le bouillon, comme fait souvent le charbon asporogène. Le tube 2 retiré de l'étuve et encore vivant au 3 février donnait à cette époque des spores dans les cultures filles.

Série H. 19 janvier 1894. Elle comprend les tubes 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8; 6 et 8 restent stériles. Les tubes sont laissés 13 jours à l'étuve sans résultat; enlevés alors et gardés à la température de la chambre, ils donnent en 24 heures des spores dans les cultures filles faites le 20 février.

En résumé, sur 28 tubes phéniqués choisis parmi les numéros perdant le plus facilement leurs spores et tenus en obser-

vation jusqu'au 23e jour au moins, nous avons eu seulement trois fois du charbon asporogène. Ce résultat était obtenu dès le 11e jour, d'où il semble résulter que lorsqu'on n'a pas de charbon asporogène du 10e au 11e jour, il est inutile de prolonger l'expérience plus longtemps, le contact avec l'antiseptique n'ayant plus d'effet utile après cette date, si nous généralisons les faits mis en lumière par les résultats des séries E et F. Peut-être qu'alors le microbe s'est accommodé à l'antiseptique et n'est plus influencé par lui. Les expériences de Kossiakoff[1] ont montré en effet que la bactéridie acclimatée aux milieux additionnés d'acide borique, de borate de soude, de sublimé, voit sa sensibilité vis-à-vis de ces agents s'émousser. Il est légitime d'admettre qu'il en est de même vis-à-vis de l'acide phénique. En tenant compte de la remarque précédente, nous pouvons ajouter au chiffre des 28 tubes précédents la série C, ce qui nous donne trois résultats positifs sur un total de 38 tubes.

Pour vaincre la résistance du charbon de Marcq à l'acide phénique, nous essayons alors un procédé analogue à celui utilisé par Phisalix pour la chaleur, c'est-à-dire la culture en série.

Les tubes 3, 4, 5, 6, 7 (série E) du 19 *août* 1893, ayant tous cultivé, sont réensemencés le 21 *août*, chacun dans le numéro correspondant d'une deuxième série phéniquée ; seuls 3 et 6 de cette deuxième série se montrent fertiles ; et le 24, on les reporte dans des troisièmes tubes phéniqués 3 et 6 où ils poussent maigrement. Toutes ces cultures donnent un bacille qui perd ses spores dans le bouillon phéniqué, mais des épreuves de chauffage, faites les 29 *août*, 2 *septembre* et 13 *septembre*, montrent que ces spores reparaissent rapidement dans les milieux nutritifs habituels. Enlevés de l'étuve après dix à douze jours, les bacilles des deuxième et troisième séries meurent plus rapidement que ceux de la première, mais au 25 *octobre*, les tubes 3 des deux dernières séries, seuls survivants, ne sont pas asporogènes.

Vis-à-vis du peu de succès de cette tentative, et de l'atteinte grave portée à la vitalité du microbe par sa culture en séries dans des milieux aussi fortement antiseptiques, nous n'essayons pas de le soumettre à l'action du bichromate de potasse avant de faire agir le phénol, ou inversement, bien convaincus d'avoir encore un plus grand nombre de cultures infertiles. Nous nous

1. Kossiakoff. *De la propriété que possèdent les microbes de s'accommoder aux milieux antiseptiques.* (Ces *Annales*, t. I, p. 465, 1887.)

adressons alors à un bacille modifié antérieurement par l'action de la chaleur.

Série I. — Du charbon de Marcq est soumis 40 jours à l'action de la chaleur à 42° à l'aide de réensemencements successifs faits de cinq en cinq jours. Il ne devient pas asporogène : une culture fille est inoculée à une souris qui meurt en trente heures avec un œdème énorme. Son sang est ensemencé le 15 *mars* 1894 dans quatre tubes 4, 5, 6, 7. Les deux derniers restent stériles; les deux premiers, soumis pour la première fois le 3 *avril* (16ᵉ jour d'étuve) à une épreuve de chauffage, contiennent un charbon resté asporogène depuis lors, malgré des cultures et des inoculations multiples.

Le succès de cette expérience démontre que dans les cas où on a affaire à une variété de *bacillus anthracis* gardant énergiquement en présence de l'acide phénique le pouvoir de sporuler, on peut venir à bout de sa résistance en le soumettant au préalable à un autre agent capable de modifier fortement sa végétation, la chaleur à 42°.

2° *Expériences avec un charbon provenant de l'Institut Pasteur.* — Ce microbe provenait du cours de M. Roux (juin-juillet 1893). Nous étions désireux de l'expérimenter comparativement avec notre charbon de Marcq. Il nous a été facile de constater qu'il donnait des bactéridies asporogènes beaucoup plus facilement ; mais pour cette variété, comme pour la première, il ne faut pas croire qu'en prolongeant l'action de l'antiseptique on finisse toujours par fixer chez une bactéridie la propriété asporogène ; nous avons toujours vu, dans nos expériences, que lorsque ce caractère n'était pas définitif le 10ᵉ ou le 12ᵉ jour, on ne parvenait pas à le fixer même en doublant ou en triplant la durée du séjour de la bactéridie dans le bouillon phéniqué. La propriété de ne plus jamais faire de spores semble due à une modification que la bactéridie ne peut éprouver que d'assez bonne heure, c'est-à-dire dans les générations qui se font du 4ᵉ au 12ᵉ jour de culture environ ; si cette modification particulière n'a pas lieu dans cette période, les bactéridies ne donnent pas de spores en présence de l'antiseptique, mais elles restent capables d'en fournir dès qu'il n'existera plus, c'est-à-dire dans un milieu nutritif normal. Toutefois, fait qui démontre bien que le microbe a subi fortement l'influence de l'antiseptique, il arrive souvent que les spores ne se développent qu'après trois jours dans le bouillon à 37° ; parfois même elles ne réappa-

raissent qu'après deux ou trois cultures successives. Par ce phénomène, que nous n'avons pas observé avec le charbon de Marcq, la sensibilité plus grande de cette variété de bacille vis-à-vis de l'acide phénique est mise en relief, même dans les cas où la dose d'antiseptique n'est pas suffisante pour le rendre définitivement asporogène. C'est ainsi qu'un tube contenant 2/10000 d'acide phénique nous fournit le 23 *novembre* 1893, 10e jour de culture, des cultures filles qui, examinées et recultivées plusieurs fois, notamment le 27 *novembre*, le 7 *décembre*, restent asporogènes jusqu'au 16 *décembre* ; mais un ensemencement fait à cette date, et soumis le 27 à une épreuve de chauffage, contient des spores. C'est là un fait exceptionnel que nous n'avons constaté qu'une fois.

3° *Expériences avec un premier vaccin charbonneux de l'Institut Pasteur.* — Une souris est inoculée avec un premier vaccin charbonneux provenant de l'Institut Pasteur et entretenu depuis deux mois au laboratoire. Avec son sang on ensemence des tubes phéniqués nos 3, 4, 5, 6, 7. Le 10e jour, on fait une épreuve de chauffage sur le seul tube ayant cultivé, le n° 4. Il fournit un charbon définitivement asporogène.

B. — PRÉPARATION DU CHARBON ASPOROGÈNE PAR LES BOUILLONS ADDITIONNÉS DE BICHROMATE DE POTASSE (PROCÉDÉ CHAMBERLAND ET ROUX).

Nous avons préparé un grand nombre de séries de cinq tubes de bouillon de veau additionné de proportions croissantes de bichromate de potasse; le 1er tube en contenait 1 p. 4,000, et le 5e 3 p. 4,000 ; le tube n° 3 contenait 2 p. 4,000, c'est-à-dire exactement la dose employée par Chamberland et Roux. Les mêmes charbons dont nous nous étions servis pour étudier l'effet de l'acide phénique ont été ensemencés dans les bouillons additionnés de bichromate de potasse. On s'assurait de l'absence ou de la présence de spores par le chauffage à 65°.

1° *Expériences avec le charbon de Marcq.* — Nous avons ensemencé avec ce charbon sept séries de tubes de bouillon additionné de bichromate. Jamais nous n'avons obtenu de bactéridie définitivement asporogène. Le plus souvent nous trouvions des spores dans les cultures. Dans un plus petit nombre de cas, la

bactéridie n'en produit pas dans le bouillon additionné de bichromate; mais les cultures filles en donnent toujours, quelles que soient la dose de bichromate (jusqu'à 3 p. 1,000) et la durée du séjour dans le bouillon ainsi préparé. C'est ainsi qu'un tube (le 5e) d'une série ensemencée le 11 juillet présente une bactéridie sans spores pendant trois mois et demi : même au bout de ce temps les cultures filles provenant de ce tube donnent en quarante-huit heures des bactéridies sporifères. Le tube voisin (le 4e) de la même série a fourni au bout de 3 mois et demi une culture fille qui est restée privée de spores pendant une dizaine de jours ; mais un nouvel ensemencement ayant été fait, des spores y sont bientôt apparues.

2° *Expériences avec le charbon de l'Institut Pasteur.* — Nous n'arrivons pas à rendre ce charbon asporogène dans trois séries de cinq tubes de bouillon additionné de bichromate de potasse. Il est même très rare de ne pas voir des spores se produire dans ces milieux.

3° *Expériences avec un 1er vaccin de l'Institut Pasteur.* — Dans une expérience, la seule que nous ayons faite, nous rendons ce charbon asporogène dans les cinq tubes d'une série, contenant comme précédemment du bichromate de potasse de 1 à 3 p. 1,000 de bouillon.

La méthode des bouillons additionnés de bichromate de potasse s'est donc montrée très inférieure pour obtenir du charbon asporogène à celle des bouillons phéniqués, du moins en ce qui concerne les charbons virulents. Nous avons noté que très souvent la présence de bichromate dans le bouillon n'empêche même pas les spores de s'y produire. Si elles manquent, la bactéridie paraît cependant conserver presque indéfiniment la propriété d'en reproduire dès qu'on l'ensemence dans des bouillons ordinaires.

En face de cet échec complet, le succès que nous obtenons en cultivant le 1er vaccin dans les bouillons additionnés de bichromate de potasse n'en est que plus remarquable. Il semble, à première vue, en faveur de l'opinion, émise par Flügge et Behring, qu'il y a des différences dans la résistance à certains agents chimiques entre le charbon virulent et le charbon atténué; dans nos expériences, le charbon-vaccin devient plus facilement asporogène que le charbon virulent. De même Behring réussit

mieux à rendre asporogène un charbon atténué qu'un charbon virulent.

C. — Tentatives pour obtenir du charbon asporogène a l'aide de bouillons additionnés d'acide chlorhydrique et d'acide rosolique.

Nous n'avons pas essayé de reproduire les expériences de Behring, dans lesquelles on cultive pendant plusieurs mois du charbon dans des gélatines additionnées d'antiseptiques. Mais nous avons cherché quels résultats donnait la culture de la bactéridie dans des bouillons contenant de l'acide chlorhydrique et de l'acide rosolique qui, dans la gélatine, avaient fourni à Behring une race asporogène. Nous n'avons obtenu aucun résultat de ce genre.

Il était inutile d'essayer de cultiver nos microbes dans un bouillon contenant plus de 1 p. 1,000 d'HCl ; déjà à cette dose il arrive parfois que la bactéridie est tuée. Nos cultures ont été faites dans des bouillons contenant de 1 p. 1,000 à 1 p. 2,000 d'HCl. A vrai dire, nos expériences ont été peu nombreuses (24 tubes) car nous n'avons pas observé que les doses de HCl, qui permettaient la végétation de la bactéridie, l'empêchassent de donner des spores : il y en a eu dans tous nos tubes, soit avec le charbon de Marcq, soit avec le 1er vaccin de l'Institut Pasteur.

Nos essais avec l'acide rosolique n'ont pas été plus heureux. Nous avons employé une solution d'acide à 1 p. 1,000; on additionnait 10 c.c. de bouillon de 1/10 de c.c. de la solution, et au-dessous. Ces doses permettent à la bactéridie de se développer ; mais elle donne des spores même 37 jours après l'ensemencement : des doses supérieures la tuent. Ces résultats étaient peu encourageants; aussi n'avons-nous fait que très peu d'expériences (7 tubes).

Il n'est peut-être pas inutile d'ajouter que, pour prévenir l'évaporation de l'acide chlorhydrique et de l'acide rosolique, nous avions soin, avant la stérilisation à l'autoclave, de fermer les tubes à la lampe au-dessus du coton. Il est digne de remarque. également, que le premier vaccin Pasteur se soit montré, vis-à-vis de ces agents, aussi indifférent que notre charbon le plus virulent.

D. — Préparation du charbon asporogène par l'application de la chaleur (procédé Phisalix).

Nous mettions à l'étuve à 42° des ballons Pasteur contenant 10 c. c. de bouillon dans lequel était semé le charbon sur lequel on expérimentait; tous les cinq jours les ballons de l'étuve servaient à en ensemencer d'autres qui prenaient leur place.

Dans une expérience faite avec le charbon virulent provenant de l'Institut Pasteur, on constate, à partir du 25e jour, que les ballons contiennent du charbon sans spores; depuis plusieurs mois ce charbon se maintient tel dans toutes les cultures sur divers milieux et après plusieurs passages par des animaux : c'est une race vraiment asporogène.

Il en a été tout autrement du charbon de Marcq dans une expérience poursuivie parallèlement, et dont les conditions étaient par conséquent identiques. Nous retrouvons encore ici un exemple de la résistance remarquable de cette race. En effet, à aucun moment, même lors du 8e ensemencement et au 40e jour de culture à 42°, les spores n'ont manqué dans les ballons qui contenaient la bactéridie de Marcq.

Enfin nous avons fait une autre tentative avec le premier vaccin de l'Institut Pasteur. A plusieurs reprises nous constatons, à partir du 18e jour, que les bactéridies n'ont pas des pores dans les ballons en expérience. Mais elles en reprennent dans chaque ensemencement qu'on porte à l'étuve à 37°. Cependant une culture fille, obtenue avec un ballon du 6e réensemencement (30e jour à l'étuve à 42°), reste asporogène, de sorte que le premier vaccin se montre un peu moins sensible à l'action des cultures successives en série que le charbon virulent de l'Institut Pasteur.

III

Un premier fait ressort des expériences que nous avons résumées plus haut, c'est la notion de la résistance extrême de certaines variétés de bactéridies aux agents susceptibles de les transformer en races asporogènes. L'histoire de notre charbon de Marcq est particulièrement intéressante à ce sujet; elle confirme, d'une façon absolue, la notion aujourd'hui établie dans la

science, en particulier depuis les recherches de C. Frænkel, de l'importance capitale qu'il faut attacher à la question de race, quand on étudie l'action sur les microbes des divers modificateurs physiques ou chimiques.

Une deuxième conclusion s'impose aussi nettement, c'est que le procédé de choix pour la préparation des bactéridies asporogènes est celui de Roux à l'acide phénique. Avec lui, on arrive à réussir. même avec des microbes qui tout d'abord ne paraissaient pas transformables; c'est ainsi qu'avec le charbon de Marcq, dans une expérience faite un an après la récolte du microbe sur l'homme, nous avons obtenu (série G) des bacilles asporogènes par le procédé de Roux suivi dans toute sa rigueur, car nous ne croyons pas que la culture à 36°-37° et non à 33° ait quelque importance en l'espèce. En présence de ce résultat tardif, nous pensons pouvoir émettre l'hypothèse que, longtemps cultivé au laboratoire dans les milieux artificiels, le bacille charbonneux devient plus malléable et plus susceptible de s'altérer morphologiquement. On s'explique alors qu'il puisse, dans certains cas, devenir asporogène sous l'influence d'agents mal déterminés comme dans les faits de Lehman, ou peu actifs comme dans le cas de l'acide chlorhydrique et de l'acide rosolique. qui ne paraissent jouir d'aucune action dans le bouillon de veau, et qui cependant, dans la gélatine à 8 0/0, ont donné deux succès à Behring, probablement parce que dans ces cas, comme dans les faits de Lehman, il convient de faire intervenir l'action du vieillissement à l'air. On sait en effet que Phisalix a démontré que l'action de l'air était nécessaire dans le phénomène de la production des races asporogènes dans son procédé; il est infiniment probable qu'il en est de même pour les autres.

Quand on rencontrera des variétés de bacilles très résistantes, on pourra, comme nous l'avons fait, tourner la difficulté en soumettant le microbe à l'action de la chaleur par des cultures successives en série à 42° avant de faire agir l'antiseptique. En faisant les réensemencements à intervalles assez rapprochés, on peut par ce moyen garder des bacilles qui, comme dans notre expérience, sont encore virulents.

Cette influence de la chaleur se transmet par hérédité aux cultures filles sporulées qui se reproduisent à la température

ordinaire de l'étuve; c'est ainsi que dans notre expérience le bacille n'était plus soumis depuis un mois à l'action atténuatrice de la chaleur, et avait été recultivé plusieurs fois, lorsqu'il a été inoculé pour être traité ensuite par l'acide phénique. Le premier vaccin de l'Institut Pasteur qui, avec l'acide phénique et le bichromate, nous a donné immédiatement du charbon asporogène, était recultivé au laboratoire depuis deux mois déjà.

Si nous rappelons que des deux races de bactéridies asporogènes obtenues par Behring, l'une provenait d'un charbon atténué par la chaleur dans le laboratoire de Flügge et correspondant à un premier vaccin Pasteur, on voit que l'action favorable d'un traitement préalable par la chaleur à 42° est un fait général. Chose curieuse, le vaccin Pasteur ne s'est pas montré plus sensible au procédé Phisalix que le charbon virulent ordinaire de l'Institut Pasteur, puisque tandis que ce dernier nous fournissait du charbon asporogène dès le 25e jour (cinquième réensemencement), ce n'est qu'à partir du 30e que le premier nous en a donné. Il est vrai que nous n'avons fait qu'une série de chaque sorte, mais le fait méritait cependant d'être noté, car on sait que M. Chauveau [1] a démontré que les spores nées d'un mycélium chauffé montrent une plus grande facilité à subir l'influence atténuatrice d'un nouveau chauffage.

Nous n'avons pas essayé de traiter le *bacillus anthracis* par le bichromate de potasse avant de le soumettre à l'action de l'acide phénique, ou inversement, convaincus par l'expérience des cultures en série dans l'acide phénique, et par ce que l'on sait de l'action des mélanges antiseptiques sur les microbes, que cette manipulation altérerait trop la vitalité du microbe, et le ferait périr trop rapidement dans les cultures.

La question des rapports existant entre l'affaiblissement de la virulence des bacilles et leur aptitude à devenir asporogènes se pose par suite de la facilité plus grande à préparer des races asporogènes avec les microbes traités au préalable par la chaleur. Pour nous, il nous semble que, ainsi que Lehman l'a déjà dit, il n'y a pas de rapport causal entre ces deux faits, malgré leur connexion apparente. Ce qui le prouve, c'est la possibilité de créer des races asporogènes très virulentes, comme

1. CHAUVEAU. (*Comptes rendu[illegible] Académie des sciences*, 1883.)

Roux l'a montré dès le début, par suite du manque de parallélisme complet qui existe entre la dégradation artificielle de la virulence et celle du pouvoir sporogène. Si les charbons déjà modifiés par la chaleur subissent plus aisément l'action de l'antiseptique, cela tient pour nous, d'une part, à ce que l'action de l'antiseptique est renforcée; on sait en effet que ces corps agissent mieux à chaud qu'à froid; or ici il se passe un phénomène analogue : seulement l'action de la chaleur, au lieu de se produire au moment même de l'application de l'antiseptique, s'est fait sentir antérieurement sur ce microbe, mais ses effets se sont transmis par hérédité absolument comme l'atténuation de la virulence; d'autre part, à ce que la bactéridie traitée par la chaleur a été atteinte dans sa végétabilité, et que par suite sa résistance aux modifications extérieures est amoindrie. En un mot, l'atténuation de la virulence et la plus grande aptitude à perdre le pouvoir de sporuler sont deux phénomènes connexes, témoignant tous les deux d'une modification permanente et héréditaire acquise par le microbe, mais la première ne crée pas la seconde.

Nous déduisons de nos expériences les conclusions suivantes :

1° Certaines races de *bacillus anthracis* sont très difficiles à transformer en bactéridies asporogènes.

2° La méthode de choix dans ce cas est le procédé de Roux à l'acide phénique.

3° Si par son emploi, on n'obtient pas de résultats immédiats, il est facile de réussir, en soumettant, au préalable, le charbon à des cultures en série à la température de 42°, avec réensemencements de cinq en cinq jours.

ÉTUVE A DÉSINFECTION

PAR CIRCULATION D'UN COURANT DE VAPEUR SOUS PRESSION

PAR MM.

L. VAILLARD
Médecin principal,
professeur du Val-de-Grâce.

BESSON
Médecin aide-major, adjoint au laboratoire
de bactériologie.

C'est un fait acquis en matière de désinfection que la vapeur d'eau *sous pression* représente le moyen le plus énergique pour la destruction de toutes les matières virulentes. Les appareils qui utilisent la vapeur d'eau à 100° peuvent rendre des services, à la condition qu'ils en assurent l'exacte pénétration dans tous les points des objets à désinfecter; à cet égard, beaucoup des modèles usités n'offrent pas les garanties désirables : ils n'assurent pas toujours l'exacte évacuation de l'air, et laissent par suite se produire des inégalités de température qui conduisent à des mécomptes faciles à éviter avec les étuves à vapeur sous pression. Ainsi s'explique la préférence dont les dernières ont été l'objet en divers pays, particulièrement en France.

Mais ces étuves à vapeur sous pression n'en comportent pas moins de sérieux inconvénients : leur complication d'abord, qui en fait de véritables machines, ne pouvant être confiées à des mains inexpérimentées ; ensuite, et surtout, leur prix très élevé. Ces considérations ne sont pas de celles dont on puisse se désintéresser.

La vulgarisation de la désinfection est une nécessité impérieuse pour la prophylaxie des maladies infectieuses. Mais, en vérité, il est difficile de vulgariser une pratique qui exige un matériel dispendieux et compliqué. Il faut simplifier l'outillage et le rendre peu coûteux.

En l'état des choses, et vu l'incontestable supériorité de la vapeur sous pression, il y avait donc intérêt à chercher la formule la plus simple pour une étuve agissant par ce moyen, puis à construire sur cette donnée un appareil présentant les qualités

suivantes : *extrême simplicité du dispositif et du maniement, efficacité certaine, fonctionnement presque automatique excluant tout mécompte dans la désinfection et toute chance d'accident, enfin prix très modéré.* Le programme est peut-être un peu ambitieux ; cependant nous pensons avoir pu le réaliser.

L'étuve que nous présentons est destinée à agir par la *circulation d'un courant de vapeur sous pression*, mais elle permet aussi, grâce à un dispositif qui ne la complique en rien, d'opérer avec la vapeur d'eau à 100°; pour ce dernier cas, applicable à certains objets susceptibles (matelas, etc.), nous proposons, afin de donner plus de garanties à la désinfection, d'adjoindre un antiseptique volatilisable, l'acide phénique, à l'eau qui sera vaporisée. Les principes qui ont guidé la construction se prêtent aussi volontiers à l'appropriation de l'appareil à des destinations diverses. De là plusieurs modèles qui ne sont en réalité que la reproduction d'un seul et même type ; pour les faire connaître tous, il suffira de décrire en détail l'étuve la plus simple, celle qui a été construite en vue des besoins de l'armée, et qui, par ses dimensions, nous semble également suffisante pour les petites agglomérations.

II

DESCRIPTION DE L'ÉTUVE

L'appareil se compose de deux pièces distinctes et séparables :

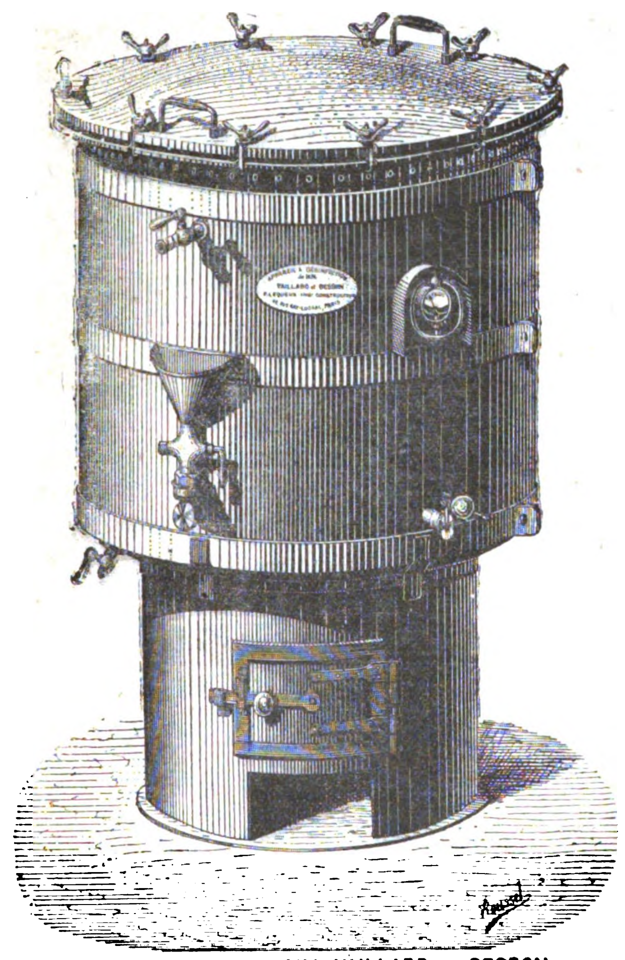
1° Le fourneau en tôle garnie de terre réfractaire, formant un socle sur lequel repose l'étuve ;

2° L'étuve proprement dite, en tôle d'acier galvanisée, comprenant dans le même corps le *générateur de vapeur et la chambre de désinfection.*

Dans son ensemble l'appareil affecte la forme verticale. (Fig. 1.)

A. *Fourneau.* — Le fourneau est disposé pour servir de support à l'étuve. A cet effet il comporte un manteau cylindrique en tôle épaisse reposant sur une plaque circulaire. Le bord supérieur de ce manteau porte un cercle en fer forgé, destiné à recevoir la chaudière de l'étuve, laquelle s'y engage de quelques centimètres ; trois fortes pattes d'assise viennent s'appliquer

contre les parois de la chaudière et donner à l'appareil la stabilité nécessaire. — La description du foyer serait sans intérêt ;



..PAREIL A DÉSINFECTION DE MM. VAILLARD ET BESSON

Fig. 1.

nous nous bornerons à dire qu'il est adapté pour tous les combustibles : houille, coke, bois, etc. [1].

B. *Étuve.* — L'étuve, en tôle d'acier galvanisée, est constituée par deux cylindres concentriques, fermés à leur partie infé-

1. Le fourneau décrit peut être remplacé sans inconvénient par un foyer fixe, maçonné.

rieure par un fond embouti et écartés l'un de l'autre, sauf à leur partie supérieure, où ils sont réunis par une pièce en fer forgé.

Le cylindre intérieur S limite la chambre de désinfection qui

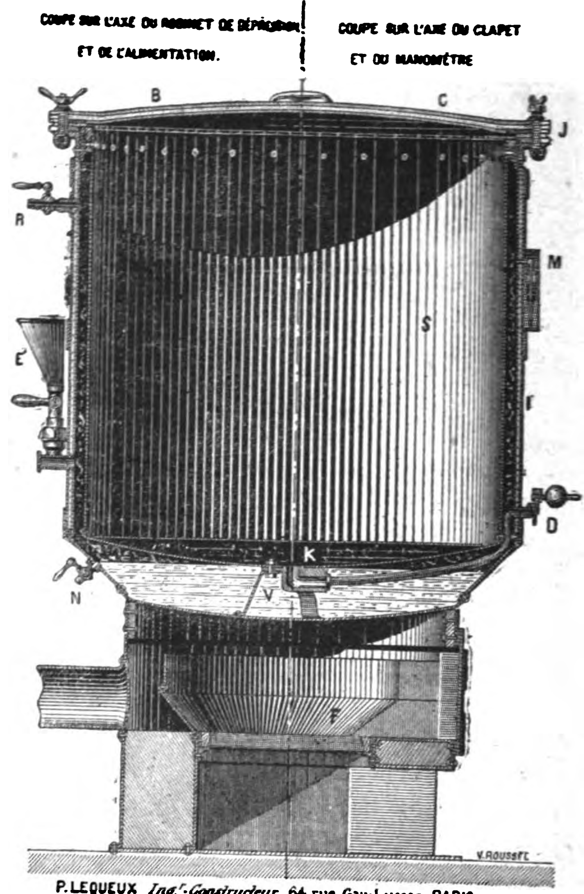


Fig. 2.

mesure $0^m,70$ de haut, sur $0^m,75$ de diamètre; sa capacité est de $0^{m^3},350$ [1].

Le cylindre extérieur I est écarté du précédent de 2 c. 5 suivant la circonférence. Son fond embouti est distant de 10 centimètres du fond du cylindre intérieur. L'espace compris entre

1. Ces dimensions n'ont rien d'invariable; elles peuvent être facilement augmentées suivant les besoins.

les deux fonds constitue la chaudière. Celle-ci reçoit l'eau au moyen d'un entonnoir latéral à robinet E. Un robinet de niveau N marque la hauteur de l'eau nécessaire à *chaque opération.*

Le cylindre intérieur est *amovible;* en l'enlevant, on peut visiter la chaudière.

La vapeur produite au fond de cette chaudière circule dans le manchon qui entoure le cylindre intérieur, aborde la chambre de désinfection par la partie supérieure et s'échappe ensuite par la partie inférieure : sa circulation dans le cylindre se fait de *haut en bas.*

A cet effet, près de son extrémité supérieure, le pourtour de ce cylindre S est percé d'une série de trous d'environ 6 millimètres de diamètre : c'est par eux que la vapeur débouche. Le fond du même cylindre est également perforé à son centre par un trou circulaire de 15 millimètres de diamètre. Ce trou correspond à un canal dans l'âme duquel est vissé un tube en fer galvanisé VD, servant à l'échappement de la vapeur. Ce tube parcourt le double fond qui constitue la chaudière, et se termine au dehors, en D, par une soupape que nous décrirons tout à l'heure. Toute communication entre la chaudière et la chambre de désinfection est rendue impossible par l'étanchéité du joint K.

Le cylindre extérieur porte à sa partie supérieure une forte cornière étanche J, dont la partie horizontale est munie de dix échancrures portant chacune un boulon à oreille ; c'est sur cette pièce que s'applique le couvercle par l'intermédiaire d'un joint en caoutchouc assurant la fermeture hermétique.

Le couvercle se compose de deux parois de tôle assemblées sur un cercle en fer forgé ; l'espace compris entre les deux parois n'a aucune communication avec l'air extérieur. Le bord du couvercle est creusé de dix échancrures destinées à recevoir les boulons ; il porte en outre deux poignées pour le maniement.

La face externe du cylindre I est garnie d'une enveloppe isolante en feutre, recouverte elle-même d'une feuille mince de tôle ou de cuivre, maintenue par trois cercles métalliques serrés au moyen de boulons. Cette paroi porte : 1° Un manomètre M protégé par un grillage, indiquant la pression et la température à l'intérieur de l'étuve ; 2° à la partie supérieure et en communication directe avec la chaudière, une prise de vapeur

sur laquelle est branché un T en bronze, portant à une de ses extrémités une soupape de grande sûreté, et à l'autre un robinet de vapeur R. Ce dernier établit et supprime à volonté la communication entre l'extérieur et l'espace limité par les deux cylindres. La soupape de sûreté est destinée à fonctionner pour une pression supérieure à celle du régime normal de l'appareil [1].

Une claire-voie mobile, en toile métallique, garnit le fond du cylindre S, et supporte les objets à désinfecter.

Dispositif placé à l'orifice de sortie de la vapeur. — Ce dispositif, représenté par la figure 3, joue un rôle essentiel dans l'économie de l'appareil. Il se compose : 1° d'un tube en bronze *a* vissé à la

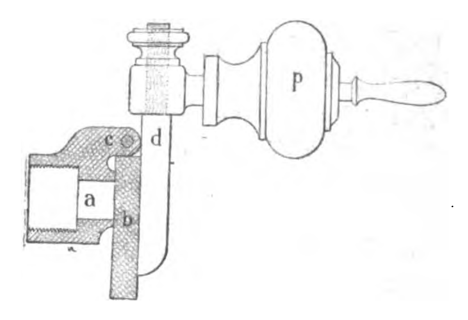


Fig. 3.

partie terminale du tube VD ; 2° d'un clapet en cuivre oscillant sur une chape *c*, et servant à la fois de moyen de réglage et de soupape de sûreté.

Ce clapet s'appuie sur les rebords amincis et bien dressés du tube en bronze. En position verticale, il obture l'orifice de sortie de la vapeur ; soulevé, il le démasque.

A la face extérieure du clapet est fixée une tige verticale *d*, qui reçoit une douille servant de support à un court levier muni d'une boule métallique *p*. Cette boule, mobile autour de la tige *d*, est destinée à agir sur le clapet pour *augmenter*, *diminuer*, *ou annihiler* la charge que cet opercule exerce sur l'orifice de sortie ; ce résultat est obtenu par le simple déplacement de la verticale passant par son centre de gravité. La charge est *maximale* lorsque

1. La soupape de sûreté n'était pas encore prévue au moment où les dessins représentant l'appareil ont été exécutés : ceux-ci ne figurent que le robinet de vapeur R ; c'est sur la même prise de vapeur que se branche la soupape.

la boule est placée dans la position indiquée par la figure, c'est-à-dire perpendiculairement à l'axe *c*; elle est *minimale* lorsque, après avoir décrit un quart de cercle, le levier se trouve parallèle au plan de l'axe *c;* pour chaque position intermédiaire aux deux précédentes, la charge varie entre le maximum et le minimum. Enfin, lorsque après avoir décrit plus du quart de cercle, la boule se trouve en arrière de l'axe *c*, son poids agit pour soulever le clapet.

Le levier et la boule métallique sont prévus de telle sorte que *le maximum de leur charge sur le clapet fasse équilibre à une pression déterminée de la vapeur qui s'écoule par le tube a.* Cette pression a été fixée à 450-500 grammes par centimètre carré; elle correspond à la température de 110°-112°, largement suffisante pour assurer la désinfection. Pour des pressions supérieures le clapet se soulève, et l'échappement de vapeur maintient la pression au degré voulu. En déplaçant plus ou moins la boule de la position où elle exerce le maximum de charge, il est facile de réduire son action sur le clapet, et, par conséquent, de diminuer à volonté la pression et la température dans l'appareil. Les différentes positions de la boule par rapport à l'axe *c* peuvent être fixées au moyen d'un écrou moleté, placé à l'extrémité de la tige *d*.

II

De la description qui précède ressortent les principales caractéristiques de l'appareil :

1° *La forme de la chaudière réalise les conditions les plus favorables à la rapidité de la mise en fonction :* la surface de chauffe est très grande et la tranche de l'eau à chauffer relativement peu épaisse;

2° *La chambre à désinfection est emboîtée dans le générateur de vapeur, et se trouve entourée dans toute son étendue par la vapeur produite.* Cette disposition, déjà appliquée à certaines étuves à courant de vapeur (étuves de Thursfield, étuve de Van Overbeck de Meyer) offre un avantage appréciable. L'échauffement de la chaudière élève la température de la chambre à désinfection et, par suite, celle des objets qu'elle contient. Aussi lorsque la vapeur aborde les effets, elle les trouve déjà à une température

qui empêche sa condensation, du moins la réduit au minimum. Le mouillage des objets se trouve ainsi évité; le séchage en devient très rapide, presque inutile;

3° *La vapeur est introduite dans la chambre à désinfection par le haut, et elle en sort par le bas.* Ce mode de circulation déjà employé par Walz et Windscheidt, puis par Van Overbeeck, est le plus favorable à la facile expulsion de l'air interposé autour des objets ou dans les mailles des tissus; il se prête ainsi le mieux à la pénétration de la vapeur dans les objets à purifier, et par suite à l'uniformisation des températures des divers points de l'étuve;

4° Le dispositif qui termine la voie d'échappement permet :

a) D'utiliser l'étuve pour la désinfection par un courant de vapeur à la pression normale;

b) De réunir à volonté la pression à la circulation de vapeur;

c) D'élever cette pression jusqu'à une limite qu'il est impossible de franchir, ou de la régler pour des degrés inférieurs.

Lorsque le clapet est soulevé, l'orifice de sortie est tel que, même avec une chauffe très active, la vapeur reste et circule à la pression normale;

5° *Lorsque l'étuve est mise en pression et le clapet disposé pour la charge maxima, la pression se règle invariablement, automatiquement pour la température de* 110-112°. L'appareil ne nécessite alors d'autre surveillance que celle qui a trait à l'entretien du foyer. La manœuvre est si simple qu'elle peut être confiée aux personnes les plus étrangères à la conduite des machines; tout danger se trouve en outre prévenu par la soupape de grande sûreté, et par la résistance de l'appareil, établi pour une pression au moins égale à 1 kilog. 500 par centimètre carré;

6° *La vapeur est toujours en circulation à tous les moments de la désinfection.* —La fermeture de l'orifice par le clapet n'est pas, en effet, tellement hermétique qu'elle ne puisse livrer aucune issue à la vapeur; celle-ci s'échappe *toujours*, faiblement il est vrai au début de la mise en marche sous pression, plus abondamment par la suite, mais sans cesse d'une manière suffisante pour établir un courant. Cette particularité est une garantie de l'éfficacité de l'étuve.

Tous les travaux sur la désinfection ont établi que l'expulsion de l'air contenu dans les objets constituait le point essentiel à

réaliser; sa présence entrave en effet la pénétration de la vapeur, l'élévation uniforme de la température dans les objets à purifier, et, par conséquent, l'action microbicide de l'agent employé. Certaines conditions ont été reconnues éminemment propres à favoriser cette expulsion de l'air, ce sont : l'échauffement préalable des effets, l'arrivée de la vapeur de haut en bas, l'augmentation de la pression et *surtout la circulation continue de vapeur*, ce sont précisément celles que nous nous sommes efforcés de réaliser [1];

7° *La disposition de l'appareil qui assure l'échauffement du cylindre intérieur permet d'opérer le séchage des effets.* — Lorsque le robinet R est ouvert et le couvercle enlevé, le courant de vapeur cesse de traverser les effets, et la chambre de désinfection devient

1. Malgré ce concours de circonstances favorables, l'expulsion complète de l'air est longue à réaliser, comme le prouve l'expérience suivante.

L'étuve est remplie par un matelas et des sacs d'étoupe. Le clapet est enlevé. Dans l'orifice de sortie de la vapeur on introduit, à l'aide d'un bouchon de caoutchouc, un tube de cuivre permettant de recueillir les gaz dans des éprouvettes plongeant dans de l'eau bouillie et refroidie.

L'étuve étant mise en fonction, le rétrécissement de l'orifice de sortie de la vapeur suffira pour déterminer une élévation de la pression intérieure jusqu'au degré que l'on obtient par l'emploi du clapet. La vapeur circulera donc sous pression, comme dans la marche normale de l'appareil. Grâce au dispositif indiqué, on peut, en mesurant à divers intervalles le volume d'air entraîné par la vapeur, suivre avec une approximation suffisante la marche de son expulsion aux différentes périodes d'une opération.

Aussitôt que la température s'élève notablement dans la chambre à désinfection, une faible quantité d'air s'échappe déjà. Mais son expulsion ne commence réellement qu'au moment où, par le fait de l'ébullition, la vapeur aborde les effets. Alors l'air qu'ils contiennent est déplacé, entraîné vers le bas; sa vitesse d'écoulement s'accroît rapidement, et ne tarde pas à atteindre 10 à 12 litres par *minute*. L'expulsion devient encore plus active dès que la vapeur commence à s'écouler par l'orifice de sortie; si la pression intérieure s'élève tant soit peu (25 grammes par centimètre carré), la vapeur entraîne alors un litre d'air par *seconde*. C'est surtout à ce temps de l'opération que la purge d'air s'effectue. Le volume d'air expulsé diminue naturellement à mesure que s'appauvrit la quantité restante, mais il demeure encore très appréciable dix minutes après l'instant où la vapeur s'est montrée à l'orifice de sortie (de 3 à 4 litres d'air par minute), pour tomber rapidement, dans les instants qui suivent, à 1/4 ou 1/5 litre par minute. On peut considérer qu'à ce moment la plus grande partie de l'air adhérent aux effets a été chassée, *mais non pas la totalité*, car la vapeur en entraîne encore des quantités mesurables. C'est seulement *de 20 à 25 minutes après l'issue de la vapeur* que l'on cesse de constater la présence de l'air. L'action des décompressions ne semble guère influer sur la rapidité de cette expulsion; après 2, 3 ou 4 détentes successives, l'entraînement *total* de l'air n'en exige pas moins 20 à 25 minutes.

Ainsi, même avec un courant continu de vapeur sous pression progressivement croissante, l'expulsion *complète* de l'air nécessite 20 à 25 minutes; les détentes plus ou moins multipliées ne l'accélèrent point. En présence de ces faits, on doit se demander si dans les étuves qui utilisent la vapeur sous pression à l'état *dormant*, et nécessitent des décompressions multipliées pour l'expulsion de l'air, celle-ci est aussi réellement assurée qu'on le croit.

une sorte de bain-marie permettant le séchage. A vrai dire cette opération sera le plus souvent inutile. Les effets sont retirés de l'étuve légèrement moites, mais à une température tellement élevée qu'il suffit de les agiter et de les exposer à l'air pour que le séchage en soit complet en peu de temps. Seuls les matelas peuvent conserver encore un peu d'humidité, et c'est pour eux surtout qu'il y a lieu de pratiquer le séchage ;

8° Au point de vue de sa construction, l'étuve ne comporte aucun organe fragile ou d'un maniement délicat. Les accessoires sont assez massifs pour être très résistants, et leur saillie est restreinte au strict minimum. Le tuyautage se réduit à l'unique tube qui sert à l'échappement de la vapeur : encore est-il inaccessible du dehors. Un agencement laissé de côté dans la description permet l'enlèvement du cylindre intérieur et la visite de la chaudière. Les avaries peuvent être réparées sur place, sans avoir recours à des mécaniciens spéciaux. Seuls, le clapet qui termine la voie d'écoulement de la vapeur, et la soupape de sûreté, s'ils venaient à être faussés par un choc violent, exigeraient un remplacement; mais ils constituent des pièces indépendantes, vissées sur les orifices, facilement démontables, interchangeables;

9° Le fonctionnement est économique (8 à 9 kil. de houille par opération), et le prix de cette étuve est très peu élevé. Son poids (280 kil.) permet de la traîner à bras d'homme sur un train à 2 roues.

III

EFFICACITÉ DE L'ÉTUVE

En raison de la certitude que la désinfection emprunte à l'emploi de la vapeur sous pression, c'est surtout à cette dernière que l'on aura le plus souvent recours. Ce mode d'opération est d'ailleurs le plus rapide, parce que la température à laquelle la vapeur est portée (110°-112°) ne nécessite qu'un temps d'application très court pour détruire les bactéries pathogènes. C'est à ce dernier point de vue que le fonctionnement de l'étuve a été particulièrement étudié, tant en ce qui concerne la marche de la température que ses effets sur les objets souillés.

Marche de la température. — L'étude prolongée du fonction-

nement de l'étuve permet d'établir comme constantes les données suivantes :

Avec 25 litres d'eau dans la chaudière et une chauffe régulière (effectuée soit en plein air, soit dans un local clos) l'ébullition est obtenue en 18 ou 20 minutes. Le robinet R étant fermé et le clapet D soulevé, la vapeur commence bientôt à s'échapper. Cinq minutes après le moment où le jet est devenu abondant, la pénétration de la vapeur à 100° est suffisamment assurée dans toute l'épaisseur des effets. Si alors le clapet est abaissé, la pression s'établit et monte rapidement à la limite fixée. Cinq minutes après l'instant où l'aiguille du manomètre a marqué la température de 110° ou 112°, les thermomètres à maxima placés à la partie *inférieure* de l'étuve, au centre de paquets mauvais conducteurs de la chaleur (étoupes grossières) indiquent exactement 110° ou 112°, comme ceux qui sont disposés dans les effets des parties supérieure ou moyenne de l'étuve.

L'élévation de la température est donc rapidement obtenue dans les parties les plus profondes, et sa répartition est régulière. Il nous reste à démontrer son efficacité.

Action désinfectante. — Il serait trop long d'énumérer par le détail les nombreuses expériences faites à ce sujet; il suffira d'en indiquer les conditions et les résultats.

Terre. — Pour apprécier la valeur d'une étuve à désinfection, on emploie fréquemment, comme matière d'expérience, la terre de rue ou de jardin; celle-ci contient, en effet, des bactéries très diverses, pathogènes ou non, munies ou dépourvues de spores; elle est, par suite, de résistance très variable et quelquefois fort grande. L'épreuve est bonne en soi, mais elle n'a évidemment qu'une valeur relative. Tous les échantillons de terre ne se ressemblent pas, exigent pour être stérilisés des températures ou des durées d'application différentes. Une mauvaise étuve pourra paraître bonne si on l'essaye avec une terre facile à stériliser, une bonne étuve paraîtra mauvaise si on tombe sur un échantillon de terre peuplé de microbes particulièrement résistants.

Quoi qu'il en soit de ces réserves, nous avons fait de nombreuses expériences avec la terre de rue ou de jardin, et les poussières de l'entrevous d'une salle d'hôpital. Ces matières, disposées en petits paquets, étaient placées au centre de matelas ou de sacs d'étoupe.

Dans un premier groupe de faits, la température à laquelle s'effectuait la désinfection n'a point dépassé 106°, elle a été appliquée pendant un laps de temps variant entre 20 et 60 minutes. Les essais ont porté sur 85 échantillons de terre ou de poussières. Sur ce nombre, 8 seulement ont été stérilisés, 77 ont donné lieu à culture; mais alors il a été reconnu que chaque culture était due *uniquement* au développement d'une seule espèce de bacille, quelquefois le *bacillus subtilis*, presque toujours une variété du bacille de la pomme de terre. Or, la résistance des spores du *bacillus subtilis* est connue; quant à la variété du bacille de la pomme de terre, nous nous sommes assurés que, à l'état de dessiccation, ses germes sont extraordinairement vivaces et supportent sans dommage pendant 10 minutes la température de 120° (vapeur sous pression).

Dans un deuxième groupe de faits, la terre et les poussières, placées également au centre de matelas ou de ballots d'étoupe, ont été soumises dans l'étuve à des températures variant entre 110 et 112° pendant 20, 25 ou 30 minutes. Sur 40 échantillons ainsi traités, 34 ont été complètement stérilisés; 6 ont donné lieu à une culture exclusivement due au développement de cette variété si résistante du bacille de la pomme de terre.

A côté de ces essais pratiqués sur la terre, il y a lieu de mentionner ceux qui ont porté sur des étoffes, telles que vieux tapis, fragments de linge ou de drap utilisés pour les nettoyages domestiques, et par suite extrêmement souillés par des germes divers. 25 échantillons de cette espèce, placés au centre d'effets soumis à l'étuvage, ont été exposés de 20 à 60 minutes à des températures n'excédant pas 106°: 23 étaient absolument stérilisés, 2 seulement ont donné lieu au développement du bacille de la pomme de terre.

Excrétions humaines. — Bacilles pathogènes. — Matières virulentes. — Il importait surtout d'établir l'action désinfectante de l'étuve sur les divers microbes pathogènes connus, les excrétions humaines (crachats, fèces) et les matières virulentes directement empruntées aux sujets atteints des maladies les plus ordinaires; et cela en se plaçant dans les conditions de la pratique, en les exagérant même.

A. — Les crachats et les matières fécales de sujets atteints de maladies diverses (non tuberculeuses) ont été étalés en couche

épaisse sur des fragments de drap, puis desséchés. Ces fragments de drap étaient placés au centre de matelas, d'effets ou de sacs d'étoupe.

Crachats. — 40 échantillons ont été soumis de 20 à 60 minutes à des températures n'excédant pas 106°; 11 ont été exposés de 20 à 30 minutes à des températures de 110 à 112°. *Tous ont été rigoureusement stérilisés.*

Il en a été de même de 34 échantillons de pus desséché.

Matières fécales. — 34 échantillons de matières fécales desséchées ont été exposés de 20 à 60 minutes à des températures ne dépassant pas 106°. — 28 étaient rigoureusement stérilisés après l'opération; 6 ont donné lieu au développement *exclusif du bacillus subtilis* ou du bacille de la pomme de terre.

B. — La plupart des bacilles pathogènes ont été soumis à l'épreuve, suivant un dispositif identique, éminemment propre à élever leur résistance au maximum. Ces microbes, puisés dans les cultures, étaient mélangés à du sérum sanguin; celui-ci était étalé en couche épaisse sur des bandes de papier, de drap ou des fragments de bois, puis desséché. Ces conditions reproduisent celles de la pratique, car, sur les linges ou effets souillés par les malades, les virus sont incorporés à des substances plus ou moins albumineuses qui, par leur dessiccation, favorisent au premier chef la conservation et la résistance de la matière dangereuse. Les différents objets ainsi souillés étaient, pendant l'étuvage, placés au centre de matelas ou de ballots d'étoupes.

Les essais ont particulièrement porté sur le bactérium coli, le bacille typhique, le vibrion cholérique, le bacille de la diphtérie, le bacille du charbon sporulé, le bacille de la tuberculose, le bacille du tétanos et le vibrion septique sporulés.

66 essais ont été faits par une exposition de 20 à 60 minutes à une température ne s'élevant pas au-dessus de 106°. Dans tous ces cas, *sans exception*, les objets souillés comme il a été dit se sont montrés stériles à l'ensemencement, et lorsque l'inoculation en a été faite aux animaux, le résultat a été *invariablement négatif*.

A fortiori les résultats ont été identiques dans tous les essais moins nombreux où la désinfection a été opérée aux températures de 110-112°.

C. — Les matières virulentes empruntées aux sujets malades étaient :

a) Des crachats tuberculeux riches en bacilles, étalés en couche épaisse sur des bandes d'étoffe, puis desséchés ;

b) Un larynx d'enfant entièrement tapissé de fausses membranes diphtériques, desséché dans le vide, puis débité en fragments comprenant toute l'épaisseur de l'organe;

c) Des échardes de bois extraites de la plaie d'animaux tétaniques, puis desséchées.

La désinfection de ces substances a été faite à des températures variant de 106° à 112°, maintenues pendant un délai de 20 à 30 minutes. *Toujours les matières virulentes ont été détruites.*

20 fragments de membrane diphtérique ensemencés aussitôt après l'étuvage n'ont donné lieu à aucun développement[1].

Dix fragments de drap supportant des crachats tuberculeux desséchés ont été inoculés dans le péritoine de jeunes cobayes; tous les animaux sont restés ultérieurement en bonne santé. Quelques-uns ont été sacrifiés deux mois après l'inoculation, et aucun d'eux n'a présenté le moindre indice de tuberculose ; les autres, maintenus en observation, gardent tous les attributs de la plus parfaite santé.

Cinq échardes de bois provenant d'animaux tétanisés ont été inoculées dans les muscles de jeunes cobayes ; aucun d'eux n'est devenu tétanique.

Ces faits sont autant de preuves démontrant l'efficacité de l'appareil; celui-ci assure la désinfection des objets souillés dans des conditions qui représentent, et dépassent même le plus souvent, celles de la pratique. Mais pour assurer la désinfection dans tous les cas possibles, il est indiqué d'opérer à la température de 110-112°.

IV

DE L'EMPLOI DE LA VAPEUR D'EAU PHÉNIQUÉE POUR LA DÉSINFECTION A 100°.

Pour un grand nombre d'auteurs (et non sans raison), la désinfection par la vapeur d'eau à 100° ne saurait donner le même degré de certitude que l'emploi de la vapeur sous pression.

1. Sept fragments du même larynx diphtérique ont été placés au centre d'effets divers et soumis pendant trente minutes à l'action d'un courant de vapeur à 100°; *trois d'entre eux ont donné lieu à une culture typique du bacille de la diphtérie.* Cette constatation n'est pas de nature à faire considérer la désinfection par la vapeur d'eau à 100° comme donnant toute garantie.

Afin de pallier à ce qu'elle peut avoir d'insuffisant, nous proposons d'opérer alors avec de l'eau contenant un antiseptique volatilisable, l'acide phénique en solution à 1,5 ou 2 0/0. A ce titre peu élevé et agissant à froid, l'acide phénique ne serait que faiblement microbicide ; à la température de 100°, en présence de la vapeur d'eau, il exerce une action plus énergique, suivant un principe bien connu.

Les essais directs démontrent que lorsqu'on chauffe une solution phéniquée titrée, l'acide phénique ne se volatilise pas d'une manière saisissable, tant que la température du liquide ne dépasse pas 90-95°. La volatilisation ne commence guère qu'avec l'ébullition. Elle est surtout active pendant les premiers temps de l'opération : à ce moment, en effet, le produit de la distillation est un peu plus riche en acide phénique que la solution soumise au chauffage. La volatilisation se continue pendant tout le temps de l'ébullition, en s'affaiblissant toutefois à mesure que s'appauvrit la solution que l'on vaporise : après 25 ou 30 minutes de vaporisation, la proportion d'acide phénique contenue dans le liquide résiduel représente à peine la moitié du titre primitif de la solution et souvent moins encore.

Il résulte de ces détails que dans une désinfection opérée avec une solution phéniquée, les deux agents mis en œuvre, vapeur d'eau et acide phénique, viennent agir de concert, au même moment. L'un et l'autre actionnent simultanément les microbes à détruire, et, en combinant leurs effets dans le même temps, les multiplient; de là une action désinfectante plus accentuée. Les faits établissent que, pour la même température, on obtient, avec la vaporisation de l'eau phéniquée à 1,5 ou 2 0/0, des effets supérieurs à ceux que donne la vapeur d'eau simple.

La vapeur d'eau phéniquée n'altère pas plus les objets, linges ou étoffes, que la vapeur d'eau ordinaire, à la condition que la solution soit faite avec de l'acide phénique pur. Son emploi semble devoir être réservé à la désinfection d'objets susceptibles de détérioration par de plus hautes températures : tels sont surtout les matelas de laine. Le prix aujourd'hui si peu élevé de cet acide n'augmentera que faiblement la dépense de chaque désinfection.

V

FONCTIONNEMENT DE L'APPAREIL

Les objets à désinfecter sont disposés dans le cylindre intérieur, de façon à ne pas dépasser le niveau des trous T ; on les recouvre d'un linge pour les protéger contre la faible quantité d'eau condensée au niveau du couvercle. Le couvercle est mis en place et solidement fixé au moyen des écrous.

Le robinet de l'entonnoir E étant ouvert, ainsi que le robinet de niveau N, on introduit l'eau dans la chaudière jusqu'à ce qu'elle s'écoule par le robinet de niveau : la quantité introduite est de 25 litres environ. Les robinets E et N sont fermés complètement. (S'il est indiqué de recourir à la désinfection par la vapeur d'eau phéniquée, on verse par l'entonnoir la quantité voulue d'acide phénique pour obtenir avec le volume d'eau contenu dans la chaudière une solution à 1,5 ou 2 0/0). *Le clapet D est fixé dans la position soulevée. Le robinet latéral R est fermé.* On allume le foyer.

18 ou 20 minutes après l'allumage, l'eau est portée à l'ébullition; la vapeur circule dans l'espace compris entre les deux cylindres, aborde et traverse les effets, et commence bientôt à s'échapper par le tube VD, d'abord faiblement, puis en jet vigoureux.

A. Désinfection par la vapeur d'eau à 100°. — Si la désinfection se fait par la vapeur d'eau à 100°, *le clapet doit être maintenu soulevé pendant tout le temps de l'opération.*

Le temps nécessaire à la désinfection commence à partir du moment où la vapeur s'échappe en jet fort et corsé par l'orifice VD. Sa durée doit être de 40 minutes au moins.

L'opération terminée, on procède au *séchage.* Le robinet R est ouvert; le couvercle de l'étuve est enlevé ainsi que le linge recouvrant les effets, et on continue la chauffe pendant une dizaine de minutes.

Le séchage terminé, les effets sont *immédiatement* retirés de l'étuve, agités et exposés à l'air.

On retourne la grille du foyer et on éloigne le feu pour arrêter l'évaporation de l'eau dans la chaudière, si une seconde opération ne doit pas être faite.

B. — *Désinfection par la vapeur d'eau sous pression.* — La chaudière étant pourvue de l'eau nécessaire, les robinets E, N sont fermés, ainsi que l'orifice latéral R. *Le clapet D est placé en position soulevée.* Le foyer est allumé.

Lorsque la vapeur s'échappe en jet vigoureux, on laisse cet échappement se produire librement pendant *cinq minutes : le clapet est alors abaissé.*

Si la désinfection doit être faite à 110-112°, le levier qui actionne le clapet est placé dans la position du maximum de charge. Aussitôt s'élèvent la pression et la température dans l'intérieur de l'étuve : on en suit la marche au moyen de l'aiguille du manomètre qui indique sur le même cadran la charge en grammes et la température correspondante. A mesure que la pression s'élève, l'échappement de la vapeur se fait plus vivement sous le clapet. Dès que la pression atteint 450 à 500 grammes, c'est-à-dire la charge correspondant à la température de 110-112°, la vapeur s'écoule davantage. Avec une chauffe convenablement dirigée, la pression reste absolument stationnaire; mais si le feu vient à se trop ralentir, la pression baisse.

Le temps nécessaire à la désinfection commence à partir du moment où l'aiguille du manomètre indique la température de 110-112° ; *on le prolonge pendant* 20 *minutes, en ayant soin de maintenir la pression au degré fixé.*

Lorsque la désinfection doit être faite à une température inférieure à 110-112°, le clapet étant abaissé, on place le levier qui l'actionne dans une position plus ou moins éloignée de la précédente. Moins la boule est éloignée de la position perpendiculaire au clapet, plus aussi la température restera voisine de 112°; plus au contraire elle en est distante et moins aussi la température s'élèvera au-dessus de 100°. Dans le quart de cercle que la boule peut décrire avant d'arriver au point où son action est nulle ou négative, il est facile de trouver la position qui donne et maintienne la température désirée; l'indication du manomètre servira de guide pour cette manœuvre bien simple.

La désinfection terminée, on procède à l'ouverture de l'étuve et au séchage.

Pour cela, et tout d'abord, *la pression intérieure de l'étuve est ramenée à la pression normale.* A cet effet, le robinet R est ouvert

progressivement, petit à petit, et avec lenteur, de façon à éviter une détente trop brusque qui déterminerait une condensation de la vapeur et le mouillage des effets. Lorsque l'aiguille du manomètre est revenue au zéro, on déboulonne et on enlève le couvercle; le linge qui recouvre les effets est également enlevé. La chauffe est entretenue pendant 5 ou 10 minutes pour opérer le séchage; celui-ci est d'ailleurs singulièrement abrégé par la faible humectation des effets et la haute température à laquelle ils se trouvent. Les objets sont ensuite retirés de l'étuve et exposés à l'air.

On retourne la grille du foyer et on fait tomber le feu.

L'alimentation de la chaudière doit être rigoureusement faite à chaque opération et le remplissage effectué jusqu'à la hauteur marquée par le robinet de niveau.

La capacité de la chaudière est de 25 litres et, pour une marche sous pression prolongée durant une heure, la consommation d'eau ne dépasse pas 10 litres; il n'en est pas moins indispensable, si une opération succède à une autre, de parfaire la provision d'eau *à chaque reprise.*

Partant de la mise en marche pour un fonctionnement sous pression, la durée totale d'une désinfection est de 60 minutes environ, séchage compris; mais l'opération qui la suit immédiatement est abrégée du temps nécessaire pour échauffer l'eau et la porter au voisinage de l'ébullition, c'est-à-dire de 15 minutes environ.

VI

En application des données précédentes, on construit des étuves de dimensions plus grandes, et qui, suivant leur destination, peuvent être *fixes* ou *locomobiles*.

Dans ces appareils, l'étuve proprement dite affecte la forme horizontale et se dispose perpendiculairement au générateur de vapeur; c'est la seule variante, car la circulation de vapeur s'y fait exactement comme dans l'étuve verticale. Tous les avantages reconnus à cette dernière, y compris le prix de revient très modéré, se trouvent donc reproduits et réalisés dans les autres types.

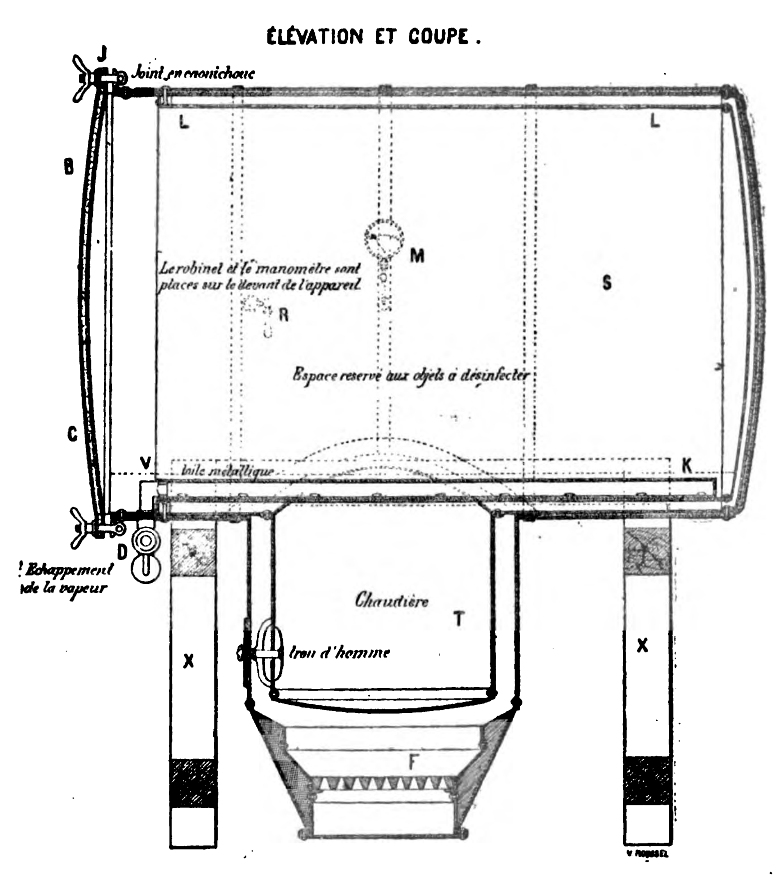
Les figures 4 et 5 en donnent le profil et la coupe. Une des

cription détaillée serait inutile; il suffira d'indiquer la disposition générale.

L'appareil se compose essentiellement :

1° Du fourneau et de la chaudière;

ÉLÉVATION ET COUPE.



APPAREIL A DÉSINFECTION DE MM. VAILLARD & BESSON.
P. LEQUEUX. Ingr-Constr 64, rue GAY-LUSSAC. PARIS.

Fig. 1.

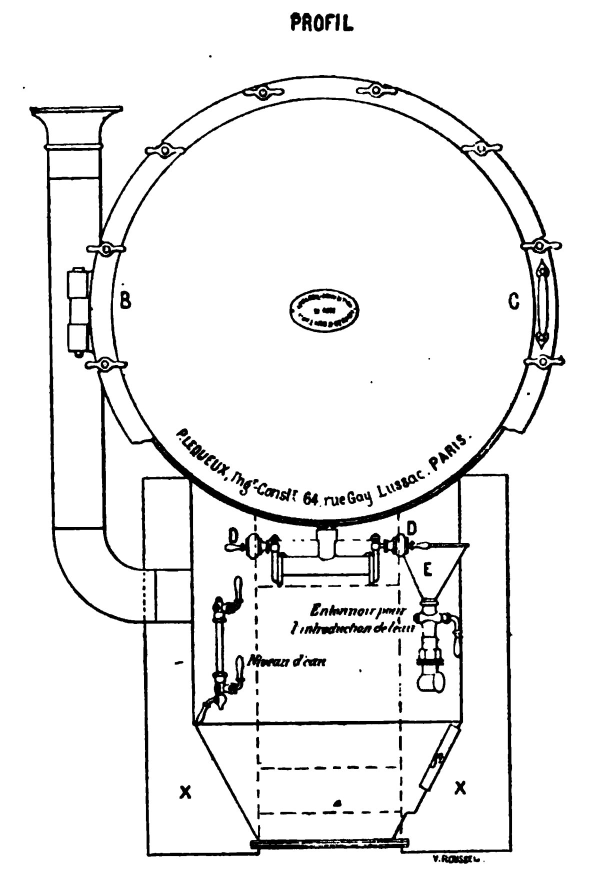
2° De l'étuve proprement dite.

Ces deux pièces forment ensemble et sont inséparables.

La chaudière, munie d'un niveau d'eau, fait corps avec le fourneau; elle est placée au-dessous et au contact de l'étuve, sans cependant lui servir de support. Bien que constituant un organe distinct, le générateur de vapeur n'est cependant pas un

organe séparé, car il se raccorde et s'abouche directement avec le cylindre extérieur de l'étuve qui lui est superposé[1].

L'étuve, disposée horizontalement, repose sur un bâtis ou



APPAREIL A DÉSINFECTION DE MM. VAILLARD & BESSON

Fig. 5.

des jambes en fer forgé, encadrant le fourneau et la chaudière. Elle se compose de deux cylindres concentriques, fermés à une extrémité par un fond fixe, et à l'extrémité opposée par un fond mobile ou *porte* qui donne accès à la chambre de désinfection. Les deux cylindres sont séparés dans toute leur étendue, sauf

1. Ce modèle peut être construit avec chaudière indépendante.

vers l'extrémité correspondant à la porte où les deux parois viennent au contact.

Le cylindre extérieur, pourvu d'une enveloppe isolante et d'un revêtement métallique, porte à sa partie inférieure une large ouverture qui se raccorde avec l'orifice de la chaudière; c'est par là que la vapeur pénètre pour circuler ensuite dans l'espace ménagé entre les deux parois.

Le cylindre intérieur reçoit les objets à désinfecter; il est perforé à sa partie supérieure de trous multiples qui donnent accès à la vapeur, et, à sa partie inférieure, de plusieurs orifices auxquels fait suite un tube d'échappement conduisant la vapeur à l'extérieur. Cette voie d'échappement comporte deux clapets à levier, réglant la pression à laquelle doit se faire la désinfection, et servant aussi de soupapes de sûreté.

Les dimensions de cet appareil peuvent varier suivant les besoins et les indications.

Cette étuve peut être montée sur un train à quatre roues, avec caisse à charbon, réservoir d'eau et accessoires. Le dispositif essentiel en est le même, avec cette différence toutefois que, pour les nécessités de la suspension, le foyer se trouve reporté vers une des extrémités de l'étuve.

NOUVEAUX FAITS RELATIFS A L'IMPOSSIBILITÉ D'ISOLER,

PAR LES MÉTHODES ACTUELLES, LE BACILLE TYPHIQUE

EN PRÉSENCE DU BACTERIUM COLI

PAR LE D[r] M. NICOLLE

Directeur du Laboratoire impérial de Bactériologie de Constantinople.

I

Les expériences de M. Grimbert et les recherches du D[r] Chantemesse ont démontré qu'il était impossible, avec les méthodes dont nous disposons actuellement, d'isoler le bacille d'Eberth dans les eaux en présence du *bacterium coli*. Depuis notre arrivée à Constantinople, nous avons pu nous convaincre de la réalité de cette opinion. Dans aucun des très nombreux échantillons d'eaux que l'on nous a demandé d'examiner, nous n'avons réussi à mettre en évidence le bacille typhique par la méthode, cependant si sensible, de M. Péré. Pourtant la fièvre typhoïde est une affection des plus communes à Constantinople et dans la région. Il est même certains puits qui sont pour les maisons tributaires une source incessante d'infection typhique; nous pourrions citer comme exemple un puits de l'île de Prinkipo, nommé puits de Garoufalia, qui entretient la fièvre typhoïde à l'état quasi permanent dans le quartier où il se trouve; l'eau de ce puits renferme en abondance du *bacterium coli* caractéristique, mais des examens répétés ne parviennent point à en isoler le bacille d'Eberth. Il nous serait facile de rapporter nombre d'exemples anssi frappants. A vrai dire, nous avons plusieurs fois rencontré dans les eaux des variétés de *bacterium coli* à caractères négatifs, qui semblent se rapprocher du bacille d'Eberth; ils s'en différencient cependant par leur croissance abondante sur la pomme de terre, par leur développement rapide sur les plaques de gélatine et, surtout, par ce fait que l'on rencontre à côté d'eux, dans les mêmes eaux, soit le *bacterium coli* classique, soit des types de transition plus ou moins

incomplets, quelquefois même tous les deux; nous nous proposons d'ailleurs de revenir sur ces variétés multiples de *bacterium coli* dont nous avons observé tant d'échantillons.

La question de la recherche du bacille d'Eberth dans les selles des typhiques est également fort controversée. Nous avons eu l'occasion de faire cette recherche chez un de nos amis atteint de dothiénentérie en janvier dernier. Or, l'examen répété des selles ne nous a jamais permis d'isoler le bacille typhique; le *bacterium coli* s'y trouvait par contre avec tous ses caractères.

Enfin, nous avons observé un fait encore plus démonstratif. Au mois de juillet dernier, on nous a demandé de faire l'autopsie et l'examen bactériologique d'un bekdji (veilleur de nuit), mort en quelques heures à l'hôpital du 2e Cercle avec des symptômes cholériformes : vomissements, diarrhée, algidité. L'autopsie a démontré qu'il s'agissait d'un cas de fièvre typhoïde ambulatoire terminée par perforation. Dans le pus de la péritonite, nous avons rencontré le *bacterium coli* à l'état presque pur, il se trouvait seul dans le sang du cœur et dans la rate. Les cultures répétées que nous avons faites avec ce dernier organe ne nous ont point permis de déceler la présence du bacille typhique.

En somme, non seulement dans les eaux, mais encore dans les selles, et même en plein parenchyme splénique, la présence du *bacterium coli* constitue un obstacle insurmontable à la recherche du bacille typhique. De nouvelles méthodes, plus sensibles que celles dont nous disposons actuellement, sont donc nécessaires pour effectuer cette recherche si importante.

SUR LE PHOSPHATE DE CHAUX
EN DISSOLUTION DANS LE LAIT

Par M. L. VAUDIN

I

Le phosphate de chaux existe dans le lait partiellement à l'état dissous. On admettait généralement, jusque dans ces derniers temps, que ce sel est maintenu dans cet état, grâce aux matières protéiques du sérum lacté; mais la découverte de l'acide citrique dans le lait, les idées que M. Duclaux a émises sur le rôle de cet élément, les recherches que j'ai faites comparativement sur le lait filtré à une température voisine de 0° et sur des mélanges salins composés de phosphate de chaux, de phosphates et de citrates alcalins, m'ont amené à prouver expérimentalement le rôle que jouent les citrates comme dissolvants du phosphate de chaux du lait [1].

Un fait cependant restait à élucider : quelle que soit la température à laquelle le phosphate de chaux gélatineux est préparé, il faut employer, pour arriver à le dissoudre, une quantité de citrate bien supérieure à celle existant normalement dans le lait. Cette circonstance est-elle due à ce que nous ne reproduisons pas exactement dans le laboratoire ce qui se passe dans l'organisme, ou bien, d'autres éléments du lait contribuent-ils aussi à rendre solubles les phosphates terreux?

En cherchant à résoudre cette question, je me suis souvenu que les solutions sucrées dissolvent facilement la chaux, et que la présence des acides organiques fixes, des sucres, peut empêcher ou au moins retarder la précipitation par les alcalis de certains sels. La considération de ces faits m'a conduit à rechercher, dans l'expérience suivante, le rôle de la lactose associée aux citrates alcalins dans la solubilisation du phosphate de chaux.

1. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1894, p. 502.

II

Le phosphate de chaux qui nous a servi a été obtenu par précipitation, à une température peu élevée, d'une solution d'os calcinés dans l'acide chlorhydrique, au moyen d'ammoniaque ou de lessive de soude étendue. En opérant en liqueur convenablement diluée, il se dépose une masse gélatineuse qu'on lave par décantation à plusieurs reprises, et qu'après un repos assez prolongé pour lui permettre de prendre de la cohésion, on recueille sur une toile.

Ainsi préparé, le phosphate de chaux renferme 12 à 15 fois son poids d'eau.

La teneur en chaux n'est pas fixe : elle varie légèrement d'une expérience à l'autre; quand on verse la lessive alcaline dans la solution du phosphate, cette proportion est généralement inférieure à 54,2 %, qui correspond au phosphate de chaux tribasique $(PO^4)^2 Ca^3$: en opérant inversement, la richesse en chaux est plus élevée. Les dosages effectués sur 4 précipités différents m'ont donné les résultats suivants : 53,80 ; 54,00 et 55,40 ; 55,90 0/0.

On mélange équivalents égaux de phosphate de chaux, de citrate de soude et de phosphate disodique, on ajoute au liquide trouble obtenu de la lactose pulvérisée et on évapore au bain-marie, jusqu'à ce que la masse soit devenue épaisse : on la dessèche ensuite à l'étuve à air chaud.

Si l'on délaye dans l'eau distillée le mélange des sels et de lactose, et qu'on élève légèrement la température, le liquide s'éclaircit après quelques instants, en ne laissant qu'un résidu à peine appréciable. Pour arriver à ce résultat en employant une dose égale de phosphate de chaux, avec le citrate alcalin seul, il en aurait fallu quatre ou cinq fois plus; le rôle de la lactose est donc parfaitement mis en évidence.

Le liquide obtenu n'est pas une solution comparable à celle qu'on obtient en traitant le phosphate de chaux par un acide, il est légèrement opalescent, mais il ne dépose que des traces de sel calcaire après un repos prolongé. Voici, du reste, les caractères de la solution obtenue. Si elle est assez concentrée et parfaitement neutre au tournesol, elle se trouble quand on la chauffe

vers 70° — 80°; par le refroidissement le précipité se redissout en grande partie. Si le mélange de sels et de lactose donne avec l'eau un liquide possédant une réaction faiblement alcaline ou acide, la solution se fait d'une manière incomplète; filtrée, elle se trouble à une température moins élevée que si elle était neutre, et quand la liqueur est refroidie, le dépôt ne disparaît pas entièrement par l'agitation; mais si l'acidité est trop élevée, la précipitation n'a plus lieu.

Si des doses très faibles d'acide ou d'alcali modifient la façon dont la solution se comporte vis-à-vis de la chaleur, les sels alcalins déterminent aussi des changements dans la stabilité des éléments dissous. Le sel marin, ajouté jusqu'à saturation à froid, provoque la précipitation du phosphate de chaux après plusieurs heures de contact; le précipité se forme seulement au bout d'un jour ou deux avec le sulfate de soude; avec le chlorure de potassium, le liquide reste louche et ne donne lieu à aucun dépôt même après plusieurs jours. Ces solutions saturées de sels abandonnent facilement le phosphate de chaux quand on les chauffe vers 40° — 50°. Les alcalis donnent naissance à un volumineux précipité qui se dépose très lentement.

Filtrée au tube poreux, la solution ne passe pas entièrement: une partie du sel calcaire est retenue, et cette proportion varie d'une opération à l'autre avec la réaction du liquide. Dans une première expérience, une solution contenant 3gr,05 de phosphate de chaux par litre, et ayant une acidité égale à 20 centigrammes, évaluée en acide phosphorique anhydre en présence de la phtaléine du phénol, a laissé filtrer 0gr,50 de sel calcique; le rapport de la portion filtrée à la quantité totale est de 0,164. Avec une seconde solution contenant par litre 1gr,25 et ayant une acidité de 28 centigrammes, le phosphate passé à l'intérieur du tube poreux pesait 0gr,15; le rapport est ici de 0,12. Il semble donc que la facilité avec laquelle les liquides considérés traversent une paroi poreuse est d'autant plus grande qu'ils sont moins acides; il en est vraisemblablement de même pour le passage à travers les membranes animales.

En résumé, le phosphate de chaux, solubilisé par les citrates alcalins en présence de la lactose, se comporte vis-à-vis de la chaleur, du filtre de terre poreuse, des sels alcalins, comme les

matières albuminoïdes. Dans l'étude du lait, les divers traitements qui amènent la précipitation de la caséine déterminent aussi l'entraînement du phosphate de chaux, et cette coexistence constante a beaucoup aidé à accréditer cette idée que les matières protéiques contribuaient à dissoudre les phosphates terreux contenus dans ce liquide.

Il nous faut, en présence des faits ci-dessus, rejeter maintenant cette hypothèse et retenir que le phosphate de chaux du lait est maintenu en solution par les citrates alcalins et la lactose.

III

Les solutions qu'on obtient en traitant les phosphates bibasique ou tribasique de chaux par un acide, contiennent finalement du phosphate monocalcique et le sel de chaux de l'acide employé. Ces liquides chauffés précipitent facilement, s'ils sont peu acides et si la concentration est suffisante; le précipité formé est toujours, quelle que soit la basicité du sel employé, un hydrate de phosphate bibasique de chaux [1]. La séparation de ce sel est accompagnée d'une diminution d'acidité de la liqueur surnageante, en prenant comme indicateur la phtaléine du phénol.

Examinons ce qui arrive avec les solutions obtenues, comme il a été indiqué, avec du citrate de soude, du phosphate de chaux et de la lactose.

A. Une solution contenant par litre 2gr,45 de phosphate tribasique de chaux et ayant une acidité égale à 0gr,35 est conservée dans un endroit frais pendant 10 à 15 jours; au bout de ce temps, elle abandonne un précipité gélatineux. On le sépare de la liqueur surnageante, on le lave par décantation un grand nombre de fois et on le recueille sur un filtre.

Le précipité séché et calciné a la composition suivante rapportée à 100 parties :

Chaux	57, 9
Acide phosphorique	42, 1

L'acidité du liquide surnageant n'est plus la même : elle s'est accrue et est égale à 0,52; il ne renferme plus qu'une faible quantité de phosphate de chaux.

1. Duclaux, *Annales de l'Institut Pasteur*, septembre 93.

Si l'on porte à l'ébullition la solution initiale et qu'on filtre, la liqueur parfaitement limpide a une acidité égale à 0,47.

B. La solution renferme par litre 3gr,05 de phosphate de chaux, son acidité est égale à 0,20. Le précipité formé contient :

Chaux	57, 4
Acide phosphorique	42, 6

Le liquide surnageant a une acidité égale 0,38 ; et le poids de phosphate de chaux qui reste dissous est de 0gr,175 par litre.

C. Le poids de phosphate de chaux dissous dans un litre de solution est de 1gr,25 et l'acidité est égale à 0,28 par litre.

Le dépôt contient :

Chaux	57, 8
Acide phosphorique	42, 2

J'ai choisi, pour en faire l'analyse, les dépôts qui se produisent au sein des solutions après un temps suffisant : ils sont plus faciles à recueillir et à laver que ceux obtenus à chaud.

Ces précipités, séchés à 120°, charbonnent quand on les chauffe au rouge ; l'un d'eux qui pesait 0gr,164, a perdu, pour devenir parfaitement blanc, 12 milligrammes, soit environ 7,3 0/0 de son poids ; le résidu de la calcination, traité par l'eau distillée, bleuit le papier du tournesol. Un autre précipité, dissous dans l'acide chlorhydrique et versé dans la liqueur de Fehling bouillante, ne la réduit pas. Traité par le permanganate de potasse en solution alcaline, il donne la coloration verte caractéristique de l'acide citrique.

La séparation du phosphate de chaux se fait donc avec entraînement d'une petite quantité de citrate, c'est ce qui explique la présence d'un excès de chaux dans le produit de l'incinération et sa réaction alcaline. L'essai à la liqueur de Fehling indique que des lavages suffisamment réitérés dépouillent tout à fait le précipité gélatineux du sucre de lait qui l'imprègne ; avec les précipités obtenus à chaud et lavés sur le filtre, cette disparition est difficile à obtenir et le plus souvent incomplète.

Il n'est pas sans intérêt de rapprocher cette constatation des remarques faites par M. Duclaux sur la ténacité avec laquelle le gâteau de caséine coagulée par la présure retient le sucre de

lait[1] ; c'est évidemment le phosphate de chaux contenu dans le caillé qui, dans ce phénomène, joue le rôle principal ; et la preuve en est faite par l'expérience citée par le même auteur, que dans la coagulation par un acide, qui agit en même temps sur le phosphate de chaux, la lactose se concentre dans le sérum, contrairement à ce qui a lieu avec la présure.

Au point de vue physiologique, ce qui résulte de ce paragraphe me semble très important à noter, et peut se résumer ainsi : toutes les influences sur les solutions considérées, qui peuvent modifier ou détruire l'équilibre moléculaire des sels dissous, tendent à précipiter du phosphate tribasique de chaux avec excès de base à l'état de citrate ; et cette séparation est accompagnée d'une augmentation d'acidité dans la liqueur surnageante. C'est ce que j'ai constaté aussi pour le lait filtré dans une étude antérieure[2].

IV

Nous avons, dans nos expériences, étant donné que notre but était de rechercher dans quelles conditions se trouve dissous le phosphate de chaux du sérum lacté, employé le sucre de lait et les citrates alcalins. Il était présumable que d'autres sucres, et vraisemblablement aussi d'autres sels alcalins à acides organiques fixes, peuvent jouer un rôle analogue ; c'est ce que plusieurs observations nous ont permis d'établir.

Dans une opération faite avec le sucre de canne, j'ai obtenu une solution qui se comporte comme celle qui a été étudiée plus haut. On a traité la liqueur de Fehling bouillante par cette solution, elle ne s'est pas réduite ; il n'y a donc pas eu inversion du sucre de canne pendant la préparation, ce qui était utile à constater. Un autre essai a été fait avec la glucose pure retirée du miel ; j'ai obtenu, moins facilement cependant, une solution qui s'est comportée comme les précédentes. Il eût été très intéressant de connaître, d'une façon précise, si les sucres de formule $C^6 H^{12} O^6$ ne possèdent pas également, au point de vue qui nous intéresse, les propriétés des sucres moins hydratés. Cette question est difficile à résoudre, car d'une expérience à

1. Duclaux, *Le Lait*, p. 202.
2. *Bulletin Soc. chimique*, 1892.

l'autre, les rapports des éléments acides et basiques peuvent subir de très légères modifications qui changent l'état physique du phosphate de chaux; en outre, comme les divers sucres ne se comportent pas de même vis-à-vis des acides et des alcalis, je n'ai pu tirer de conclusions fermes des essais que j'avais entrepris.

Les sels alcalins de plusieurs acides organiques fixes, notamment les tartrates, les malates, se comportent en présence des sucres comme les citrates, mais leur pouvoir dissolvant est beaucoup moindre que celui de ces derniers.

Ces expériences nous amènent à penser que la dissolution du phosphate de chaux par les citrates et la lactose, dans un liquide organique tel que le lait, n'est pas un fait isolé. Des recherches, que j'ai commencées il y a plusieurs mois, montrent que des phénomènes analogues se produisent constamment dans la nature; j'espère les publier prochainement.

REVUES ET ANALYSES

DE LA RÉACTION DE L'IODE SUR L'AMIDON

REVUE CRITIQUE

Qu'est-ce que l'amidon ? A cette question, les botanistes répondront que c'est un aliment de réserve, formé dans une portion différenciée du protoplasma, nommée *amyloleucite*, par intussusception des matériaux solubles de la cellule, dans laquelle le granule d'amidon grossit à la façon d'un sac qui se remplit, de façon que sa couche la plus ancienne est la couche extérieure. A cette notion, les micrographes ajouteront que le mode d'accroissement du granule se traduit dans sa structure : les sacs invaginés les uns dans les autres qui le constituent ont des degrés de réfringence inégaux, et tracent à sa surface ces lignes concentriques, alternativement claires et obscures, qu'il est si facile d'observer sur l'amidon de pomme de terre. Enfin, les chimistes, consultés, ont pu attribuer, en partie au moins, ces différences d'éclat des couches superposées à des différences dans leur teneur en eau, attendu qu'elles disparaissent ou s'atténuent à la fois lorsqu'on dessèche le granule et lorsqu'on l'humecte beaucoup, c'est-à-dire qu'on régularise l'état d'hydratation de ses diverses pellicules. Ces mêmes chimistes croient aussi pouvoir affirmer qu'en moyenne la quantité d'eau d'hydratation va en croissant de l'extérieur à l'intérieur du granule ; mais quand on leur demande de quoi est formé l'amidon, si c'est un composé chimique ou s'il y en a deux ou plusieurs, ils font ce qu'ils font souvent, par exemple à l'égard des matières albuminoïdes, ils ne répondent pas : ils laissent la parole à qui se croit en mesure de la prendre.

C'est Nægeli, qui, dans un travail célèbre (*Die Stärkekörner*), leur a donné sur l'amidon les renseignements admis aujourd'hui dans la science. En soumettant l'amidon cru, dans certaines conditions de température, à l'action de la salive ou à celle des acides étendus, Nægeli a vu entrer en solution une substance, empruntée de préférence aux couches profondes du granule, colorable comme lui en bleu par

l'iode, et appelée, de ce fait, du nom de *granulose;* il reste en suspension dans le liquide et le filtre retient, d'un autre côté, des fragments pelliculaires ou amorphes, empruntés de préférence aux couches les plus superficielles du granule, et qui, soumis à une digestion prolongée qui les débarrasse de granulose, ne se colorent plus par l'iode qu'en jaune rougeâtre; c'est l'*amylocellulose* de Nægeli, pour lequel le granule est formé de deux individualités chimiques superposées ou enchevêtrées l'une dans l'autre, la granulose et l'amylocellulose.

Les chimistes ont enregistré cette conclusion avec le respect que méritaient le nom et l'autorité de Nægeli; mais ils ne se sont pas tous laissés convaincre. La seule réaction différentielle entre l'amylocellulose et la granulose était l'action de l'iode. Or, pour diverses raisons, cette réaction paraît être une réaction physique, tout au plus analogue à un phénomène de teinture, et non une réaction chimique capable de servir à définir le corps auquel elle s'applique, et de le distinguer de celui auquel elle ne s'applique pas.

J'ai essayé de montrer, dans un travail déjà ancien inséré aux *Annales de chimie et de physique* (4e S. t. XXV, p. 472) que le corps coloré improprement nommé iodure d'amidon n'avait à aucun degré les caractères chimiques d'un composé défini, qu'il était bleu au même titre que la la dissolution d'iode dans le chloroforme est rouge, celle dans le sulfure de carbone brune; la dissolution d'iode dans le granule d'amidon est bleue. On obtient de même une teinte bleue en versant une solution d'iode dans une masse gélatineuse de sous-acétate de lanthane; mais il n'y a pas plus de combinaison ni de composé chimique défini dans un de ces cas que dans l'autre.

Je ne reviendrai pas sur ce plaidoyer, ayant à cœur aujourd'hui de le reprendre avec d'autres arguments, empruntés à des observations récentes au sujet des relations entre l'amylocellulose et la granulose. On a vu en effet, depuis Nægeli, que l'amylocellulose colorable en jaune par l'iode pouvait, par une digestion plus prolongée, ou faite à plus haute température, se dissoudre et devenir colorable en bleu, mais on expliquait sa transformation en admettant qu'elle s'était *hydrolysée*, combinée avec les éléments de l'eau, pour passer à l'état de granulose. Mais s'il en est ainsi, la transformation subie devrait être définitive. On sait combien il est difficile, lorsque le sucre candi s'est hydrolysé, a absorbé un molécule d'eau pour se transformer en sucre interverti, de revenir de ce sucre interverti au saccharose originel. Or, cette transformation inverse, impossible avec le sucre, se ferait au contraire avec une facilité extrême entre l'amycellulose et la granulose.

Ce qui le prouve, ce sont des observations de Fitz, corroborées par

celles de Grimbert (ces *Annales*, t. VII, p. 353). Il y a beaucoup de microbes capables d'attaquer l'amidon cru ou cuit et de ne laisser qu'un résidu se colorant en jaune par l'iode ; on pourrait dire qu'eux aussi, comme les diastases, distinguent entre la granulose qu'ils consomment et détruisent, et l'amylocellulose, qu'ils respectent. Mais voici la difficulté. La matière restant sous forme d'amylocellulose avait été chauffée pendant la stérilisation préalable de la culture et avait certainement passé alors à l'état de granulose colorable en bleu par l'iode, car le changement de constitution du liquide par suite de la fermentation ne suffit pas à expliquer le bleuissement, et c'est l'action de la température qui est prédominante. La granulose, originairement produite par la chaleur, est donc repassée avec le temps à l'état d'amylocellulose, et c'est là une transformation inverse qui ne s'explique pas si la granulose et l'amylocellulose sont des substances distinctes.

Elle s'explique au contraire facilement si on admet qu'elles ne diffèrent l'une de l'autre que par une circonstance de l'ordre physique, par des différences dans l'état d'agrégation des molécules, dans le degré de coagulation. La chaleur, en amenant la pénétration de l'eau dans les pellicules d'amylocellulose, les gonfle, les dissocie, permet à la dissolution d'iode de les pénétrer et de les colorer en bleu. A froid, les couches dissociées se rapprochent, la coagulation leur rend leur état d'agrégation, et elles reprennent les propriétés de l'amylocellulose pour redevenir de la granulose si on les chauffe à nouveau.

On peut alors utilement rapprocher cette conclusion d'une expérience déjà ancienne de Payen, qui, prenant non pas seulement de l'amylocellulose, mais de la cellulose authentique, non colorable par l'iode, la voit se colorer en bleu, une fois qu'elle a été humectée d'acide sulfurique. Là encore on pourrait dire qu'il y a régression, commencement d'action chimique : on sait, en effet, que l'acide sulfurique finit par transformer la cellulose en sucre. Mais cette même cellulose, qui se colore en bleu quand elle est imprégnée d'acide, ne se colore plus du tout quand on l'a bien lavée et qu'elle a pu reprendre son premier état d'agrégation. Il n'y avait donc pas d'action chimique : il n'y avait qu'une modification dans l'état physique.

En faveur de cette conception, qui ne voit entre l'amylocellulose et la granulose que des différences dans le degré d'agrégation et de résistance à la pénétration de l'eau et des réactifs, nous pouvons citer des faits qui ont reçu, il est vrai, une autre interprétation, mais qui se comprennent beaucoup mieux, examinés à cette lumière nouvelle. Je veux parler des expériences de MM. Brown et Héron (*Journal of the chem. Soc.* 1879. p. 611). Une pâte contenant 5 a 6 0/0 d'amidon est

traitée a froid par 1/10 de son volume d'extrait de malt. En 10 minutes, la masse devient liquide et peut être filtrée. Ce qui reste sur le filtre, bien macéré et lavé, est de l'amylocellulose. Traitons de la même façon un empois à 3 0/0 d'amidon : il n'y a plus d'amylocellulose. Qu'a-t-elle pu devenir? Elle a passé au travers du filtre, entraînée, dit-on, par la granulose, et confondue avec elle. Mais de l'amylocellulose soluble n'est plus de l'amylocellulose. Ce n'est pas tout. Le liquide de filtration de l'empois à 6 0/0, limpide tout d'abord, se trouble au bout de quelques minutes, et donne un précipité floconneux qui ne se colore pas en bleu par l'iode et ne semble différer que par sa structure de celui que ce filtre a séparé. L'amylocellulose qui est entrée en solution peut donc se coaguler à nouveau.

L'amylocellulose restée sur le filtre peut à son tour se dissoudre. Il suffit de la chauffer quelques instants à l'ébullition. Le liquide devient colorable en bleu par l'iode, comme dans l'observation de Fitz et de Grimbert. Toutefois, ce traitement laisse encore un résidu que l'eau bouillante n'attaque plus que très lentement, mais qui se dissout rapidement dans une solution de potasse, et peut en être reprécipité par un acide. Une partie de cette matière a alors acquis les propriétés de la granulose. Une autre conserve celles de l'amylocellulose, et il faut une plus longue digestion avec la potasse pour les lui faire perdre. Tout cela est inexplicable si on admet que l'amylocellulose et la granulose diffèrent autant que le saccharose et le sucre interverti. Tout cela s'explique au contraire si on n'y voit qu'un nouvel exemple des phénomènes présentés par toutes les substances coagulables, qui s'émulsionnent dans un liquide en y foisonnant, comme les gommes, et qui peuvent perdre cet état de solution apparente, se coaguler sous une foule d'influences, se précipiter après filtration, on se redissoudre après précipitation. J'ai assez insisté sur ces phénomènes (*Ces Annales*, t. VI et VII), pour juger inutile d'y revenir.

En somme, nous retrouvons ici, dans une observation indépendante et plus minutieuse, des faits du même ordre que ceux de Fitz et de Grimbert. Il y a toutes les transitions, dans un sens et dans l'autre, entre la granulose la plus facilement soluble et l'amylocellulose la plus résistante, et si on ne veut pas tronçonner cette chaîne en segments mal définis, il faut se résoudre à n'y voir qu'une corde de chanvre dont les fils, les torons sont plus ou moins tordus, et par là plus ou moins résistants, mais qui, d'un bout à l'autre, est formée des mêmes éléments.

Là où cette corde est bien serrée, elle ne se teindra que d'une façon superficielle si elle est plongée dans un bain colorant. Là où elle est effilochée, elle se teindra dans tous ses brins, et les teinturiers savent que

sa coloration ne sera pas la même dans les deux cas. Voici qui démontre qu'il en est de même avec la teinture d'iode et l'amidon. Par un procédé sur lequel ce n'est pas l'occasion d'insister, M. Musculus (*Bull. soc. chim.* 1874, t. XXII, et XXVI) a préparé un amidon soluble dans l'eau, donnant un liquide homogène, privé de ces pellicules colorables par l'iode, bien que souvent invisibles à l'œil, qu'on trouve dans les solutions amylacées, et qui, une fois colorées, masquent toutes les autres teintes. On peut donc, en étendant d'eau cette solution d'amidon soluble, étudier ce que devient avec elle la dilution de la teinte bleue donnée par l'iode, et passer ainsi de la dilution qui peut être considérée comme correspondant à une coloration de surface pour l'amylocellulose, à la concentration qui peut être considérée comme coloration de fond pour l'amidon. Or, on trouve que la correspondance est presque parfaite. La solution étendue se colore en rouge brun comme l'amylocellulose. « En la laissant évaporer à l'air libre, on voit la teinte virer de plus en plus au violet, et quand la concentration est assez grande, on observe une magnifique coloration d'un bleu pur. Si on ajoute alors de l'eau, la couleur violette reparaît pour être remplacée bientôt par le rouge pur. » Rien ne montre mieux, il me semble, combien il a été imprudent de donner à cette coloration par l'iode autant d'importance, et d'en faire un moyen de distinction entre deux corps si voisins. Je ne dis pas, bien entendu, que l'amylocellulose et la granulose sont des corps identiques au point de vue chimique, ni surtout qu'ils sont *toujours* identiques. Je développerai bientôt ce point de vue. Pour le moment, je voulais seulement prouver que l'action de l'iode ne peut pas nous dire qu'ils sont différents de nature. Elle nous apprend seulement qu'ils sont différents de contexture : l'un, nous dit-elle, est du carton et l'autre du papier mâché.

E. Duclaux.

Institut antirabique de Naples, dirigé par M. le professeur A. Cardarelli. Statistique portant sur mille mordus, par MM. E. Germano et A. Calabrese. (*Giorn. Intern. di Scienze mediche* 1894.)

Nous avons déjà eu à plusieurs reprises l'occasion de parler, dans ces Annales, de l'Institut antirabique fondé à Naples par le regretté professeur A. Cantani, et qui, à peine ouvert depuis un an, fut obligé de se fermer faute de ressources. Il se rouvrit six mois après, et sauf cette interruption, il a traité, du mois d'août 1886 à la fin d'avril 1894, mille personnes dont il publie la statistique.

Une série de tableaux indique pour chacune des personnes traitées

les noms et prénoms, lieu d'origine, âge, date et siège des morsures, si elles ont saigné et ont été cautérisées, et à quelle catégorie appartenait l'animal mordeur, c'est-à-dire si sa rage était sûre, probable ou douteuse. Sur ces mille mordus, il y a eu 14 morts. La mortalité globale est de 1,4 0/0, mais si on en retranche, comme on en a le droit, les morts survenues pendant le traitement ou moins de quinze jours après la fin de ce traitement, le chiffre retombe à 0,8. MM. Germano et Calabrese ajoutent qu'ils pourraient même avec quelque sévérité le réduire à 0,6, mais il faut se montrer beau joueur, et mettre au compte des insuccès de la méthode tout ce qui est douteux.

Le tableau suivant donne la distribution des morts par catégories de l'animal mordeur : A. rage démontrée ; B. rage prouvée par observations vétérinaires ; C. rage probable mais non sûre :

Catégorie.	Nombre de mordus.	Morts.	Mortalité 0/0.
A	291	4	1,37
B	486	7	1,44
C	223	3	1,34
	1 000	14	1,40.

La mortalité globale est à peu près la même dans les diverses catégories. Les animaux mordeurs ont été : chiens 655 fois ; chats 21 ; ânes 6 ; loups 5 ; cheval, bœuf, mulet et porc, chacun une fois ; soit en tout 691 animaux mordeurs pour 1,000 mordus.

Dx.

TABLE DES MATIÈRES

TABLE ALPHABÉTIQUE PAR NOMS D'AUTEURS

MÉMOIRES ORIGINAUX

REVUES ET ANALYSES

REVUES CRITIQUES

STATISTIQUES DE L'INSTITUT PASTEUR

PLANCHES HORS TEXTE

Sceaux. — Imp. Charaire et Cie.